



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**Ανίχνευση και ποσοτικός προσδιορισμός φυτοφαρμάκων και των μεταβολιτών τους, κατά του δάκου της ελιάς σε μέλισσες και προϊόντα μελισσών, με υγρή χρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μαζών σε σειρά (LC-MS/MS) και αέρια χρωματογραφία δίδυμης φασματομετρίας μαζών (GC-MS/MS)**

**Determination and quantification of pesticide residues, in bees and bee products using LC-MS/MS and GC-MS/MS analysis, after the application of plant protection formulas to olive oil trees against *Dacus* (*Bactrocera*) *oleae*.**



**ΓΙΑΝΝΟΥΚΟΥ ΑΝΤΩΝΙΑ  
ΦΑΡΜΑΚΟΠΟΙΟΣ**

**ΑΡΙΘΜΟΣ ΜΗΤΡΩΟΥ: M041817005**

**ΛΑΡΙΣΑ 2019**



**ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ  
ΓΙΑΝΝΟΥΚΟΥ ΑΝΤΩΝΙΑ**

Επιβλέπων:

Δρ **Κ. Κασιώτης**, Αναπληρωτής Ερευνητής του Εργαστηρίου Τοξικολογικού Ελέγχου Γεωργικών Φαρμάκων (ΕΤΕΓΦ) του Μπενακείου Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου

Τριμελής εξεταστική επιτροπή:

Δρ Κωνσταντίνος Κασιώτης, Αναπληρωτής Ερευνητής του Εργαστηρίου Τοξικολογικού Ελέγχου Γεωργικών Φαρμάκων (ΕΤΕΓΦ) του Μπενακείου Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου

Δρ Δημήτρης Κουρέτας, Καθηγητής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών – Τοξικολογίας

Δρ Σέρκος Χαρουτουνιάν, Καθηγητής, Αντιπρύτανης του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών

## Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Δρα Κ. Κασιώτη, Αναπληρωτή Ερευνητή του Εργαστηρίου Τοξικολογικού Ελέγχου Γεωργικών Φαρμάκων (ΕΤΕΓΦ) του Μπενάκειου Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου, επιβλέποντα, για την εμπιστοσύνη, τη βοήθεια και την καθοδήγησή του προκειμένου να ολοκληρωθεί η παρούσα εργασία, τον καθηγητή Δρα Δ. Κουρέτα, για την δυνατότητα που μου έδωσε να συμμετάσχω στο συγκεκριμένο μεταπτυχιακό πρόγραμμα και να πραγματοποιήσω την εργασία μου στο Μπενάκειο Ινστιτούτο καθώς και τον καθηγητή Δρα Σ. Χαρουτουνιάν και Αντιπρύτανη του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών για τη συμμετοχή του στην τριμελή επιτροπή.

Επιπλέον θα ήθελα ιδιαιτέρως να ευχαριστήσω την Δρα Κ. Μαχαίρα, Διευθύντρια του Μπενάκειου Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου και Προϊσταμένη του ΕΤΕΓΦ, που με δέχτηκε στο συγκεκριμένο εργαστήριο καθώς και την Δρα Ε. Μπεμπέλου, Εντεταλμένη Ερευνήτρια στο Μπενάκειο Φυτοπαθολογικό Ινστιτούτο και την Δρα Κυριακή Βαρίκου του Ινστιτούτου Υποτροπικών Φυτών και Ελαίας Χανίων του ΕΛΓΟ Δήμητρα για την πολύτιμη συμβολή τους στην εκπόνηση της παρούσας εργασίας.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κύριο Παπίνη, την οικογένειά μου, την Μαρία και την Ηλέκτρα για την συμπαράστασή τους και την βοήθεια που μου προσέφεραν.



## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Ευχαριστίες.....	4
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ .....	5
Abstract.....	8
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	9
ΠΙΝΑΚΑΣ ΣΥΝΤΜΗΣΕΩΝ ΟΡΩΝ .....	11
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	13
ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ .....	13
1. ΕΛΙΑ ΚΑΙ ΕΛΑΙΟΔΕΝΤΡΟ .....	13
1.1. Ιστορικά στοιχεία.....	13
1.2. Μορφολογία της ελιάς .....	14
1.3 Ο ελαιόκαρπος.....	16
1.4. Ελαιόλαδο .....	18
1.5. Ποικιλίες.....	18
1.6. Παραγωγή και νομοθεσία .....	19
1.7. Ασθένειες και εχθροί της ελιάς .....	20
2. ΔΑΚΟΣ ΤΗΣ ΕΛΙΑΣ, <i>Bactrocera</i> ( <i>Dacus</i> ) <i>oleae</i> (Gmelin).....	24
2.1. Προέλευση και εξάπλωση .....	24
2.2. Συστηματική Κατάταξη .....	25
2.3. Μορφολογία .....	25
2.4. Βιολογικός κύκλος του εντόμου .....	26
2.5. Ξενιστές του εντόμου .....	28
2.6. Ζημιές και οικονομική σημασία .....	29
2.7. Καταπολέμηση του δάκου της ελιάς.....	29
2.7.1. Δολωματική μέθοδος.....	30
2.7.2. Ψεκασμοί κάλυψης.....	30
3. ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ .....	31
3.1. Ορισμός και ταξινόμηση .....	31
3.2. Ιδιότητες Παρασιτοκτόνων .....	32
3.3. Εντομοκτόνα .....	35
3.3.1. Οργανοφωσφορικά .....	35
3.3.2. Πυρεθροειδή.....	36
3.3.3. Οργανοχλωριωμένα .....	37
3.3.4. Νεονικοτινοειδή.....	37
3.3.5. Καρβαμικά .....	38
3.3.6. Spinosyns.....	38

3.4. Φυτοπροστατευτικά προϊόντα και περιβάλλον .....	38
4. Η ΜΕΛΙΣΣΑ.....	39
4.1. Συστηματική Κατάταξη .....	39
4.2. Βιολογικός κύκλος .....	40
4.3. Η διατροφή της μέλισσας .....	40
4.4. Μέλισσα και επικονίαση .....	41
4.5. Προϊόντα της κυψέλης.....	41
4.6. Δηλητηριάσεις μελισσών από φυτοπροστατευτικά προϊόντα.....	42
5. Ανίχνευση και ποσοτικός προσδιορισμός φυτοφαρμάκων με υγρή χρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μαζών σε σειρά (LC-MS/MS) και αέρια χρωματογραφία δίδυμης φασματομετρίας μαζών (GC-MS/MS).....	45
5.1. Κατεργασία δείγματος.....	45
5.1.1. Τεχνική QuEChERS.....	45
5.2. Εισαγωγή στις χρωματογραφικές τεχνικές.....	47
5.2.1. Είδη χρωματογραφικών τεχνικών .....	47
5.3. Αέρια Χρωματογραφία (Gas Chromatography – GC) .....	48
5.3.1. Οργανολογία αέριας-υγρής χρωματογραφίας.....	48
5.3.2. Εφαρμογές της χρωματογραφίας αερίου-υγρού .....	50
5.3.3. Διασύνδεση της αεροχρωματογραφίας με φασματοσκοπικές τεχνικές (GC/MS) .....	50
5.4. Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) .....	51
5.4.1. Οργανολογία HPLC.....	52
5.4.2. Είδη HPLC .....	53
5.5. Φασματομετρία μοριακών μαζών.....	53
5.5.1. Φασματόμετρα μαζών .....	54
5.5.2. Σύστημα εισαγωγής του δείγματος.....	55
5.5.3. Πηγές ιόντων .....	55
5.5.4. Αναλυτής Μαζών.....	56
5.6. Χρωματογραφία/φασματομετρία μαζών.....	57
5.7. Τεχνική Φασματομετρίας Μαζών σε σειρά (MS/MS) .....	58
6. Επιλογή αναλυτικής μεθόδου .....	59
6.1. Μέση τιμή δείγματος.....	59
6.2. Τυπική απόκλιση (s) και μεταβλητότητα (s <sup>2</sup> ) δείγματος .....	59
6.3. Σχετική τυπική απόκλιση και συντελεστής μεταβλητότητας .....	60
6.4. Απόλυτο και σχετικό σφάλμα .....	60
6.5. Επαναληψιμότητα και Αναπαραγωγιμότητα .....	62

6.6. Ευαισθησία .....	62
6.7. Όριο ανίχνευσης και Δυναμική περιοχή.....	62
6.8. Εξειδίκευση και Εκλεκτικότητα.....	63
6.9. Μέθοδος εσωτερικού προτύπου.....	63
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	64
7. Χημικά και εξοπλισμός .....	64
7.1. Υλικά και εργαστηριακές συσκευές.....	64
7.2. Διαλύτες και αντιδραστήρια.....	64
7.3. Πρότυπα διαλύματα .....	65
7.4. Εσωτερικό πρότυπο .....	66
8. Δειγματοληψία και κατεργασία δειγμάτων .....	66
8.1. Περιοχές-Δειγματοληψία .....	66
8.2. Κατεργασία δειγμάτων .....	67
8.2.1. Κατεργασία δείγματος μέλισσας.....	67
8.2.2. Κατεργασία δειγμάτων μελιού.....	68
8.2.3. Κατεργασία δειγμάτων βομβίνων .....	69
9. Οργανολογία.....	70
9.1.HPLC-ESI-MS/MS.....	70
Προετοιμασία συστήματος υγρής χρωματογραφίας.....	70
Σύστημα HPLC-MS/MS .....	70
9.1.1. Λειτουργία συστήματος υγρής χρωματογραφίας.....	70
9.1.2. Λειτουργία συστήματος φασματομετρίας μαζών .....	71
9.2. GC-MS/MS.....	72
9.2.1. GC-ECD .....	73
10. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....	74
10.1. Αξιολόγηση αναλυτικής διαδικασίας-Επικύρωση αναλυτικών μεθόδων.....	74
Βιβλιογραφία .....	84

## Abstract

In this work, a multi-residue method was used for the determination of pesticides and their metabolites, after the application of plant protection formulas (either as full coverage or as a bait) to olive oil trees. Moreover, this method was implemented to assess the impact of these substances on the olive tree pollinators and their products. For this purpose, the samples, i.e. bees (*A.mellifera*), bumblebees (*Bombus* spp.) and honey, were collected from the end of June 2018 until the middle of October 2018, at Chania, Crete, after the application of plant protection formulas to olive trees (Koroneiki variety) to investigate the residues of target analytes and their metabolites of different chemical classes. These were the pyrethroids, Beta-cyfluthrin and Lambda-cyhalothrin and the organophosphates dimethoate and its metabolite omethoate. The applied technique for the extraction and isolation of the target analytes is the QuEChERS, as enhanced by Wiest L. et al. The samples were screened using a High Performance Liquid Chromatography coupled to a Quadrupole Mass Spectrometer (HPLC-MS/MS) system in order to identify organophosphates and a GC-MS/MS system in order to identify the pyrethroids in our samples.

The methods were validated in order to determine pesticides and their metabolites. Based on 2002/657/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results, we detected the target substances in our samples, following the SANTE/11813/2017 guideline. In our method the quantitation limits (LOQs) are the lowest concentrations of each analyte to the respective spiked blank matrices (honey, bees, bumblebees) in terms of trueness and precision. The trueness was estimated by recovery measurements of three different concentration levels of the target analytes spiked to matrices expressed as % recovery. The impact of the matrix effect was estimated very low.

73 samples were analyzed: 35 bee samples, 8 bumblebee samples, 30 honey samples. Regarding the honey samples, dimethoate and its metabolite omethoate were the main substances that were detected. Maximum Residue Levels (MRL) of dimethoate and omethoate in honey have not been estimated to date. The LOQs of all the active substances found in honey samples (that were collected from the areas where both full coverage and bait applications took place) were found lower than the MRLs and without any significant variability regarding their concentration levels. As for the bees and the bumblebees, the LOQs were estimated lower than the acute oral and dermal LD50 levels. The highest concentrations in the bumblebee samples, were found in samples that were collected from the areas where the bait application had taken place. All of the target analytes were detected in the bee samples (Beta-cyfluthrin was not detected in any other sample).

Despite the fact that bees are not considered to be primarily attracted by the olive tree, this thesis clearly showed a connection and mostly an interaction between the application of plant protection formulas to the olive trees and the bees, bumblebees and the honey (as the main bee product). This also makes more important the need of monitoring bee population (even the wild bees population), when they are near to areas planted with olive trees and especially when there are no other flowers that attract them more.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα μεταπτυχιακή εργασία χρησιμοποιήθηκε μια πολύ-υπολειμματική μέθοδος για τον προσδιορισμό υπολειμμάτων γεωργικών φαρμάκων και μεταβολιτών τους, μετά από εφαρμογή φυτοπροστατευτικών προϊόντων (είτε ως ψεκασμοί κάλυψης είτε με τη δολωματική μέθοδο) στην καλλιέργεια της ελιάς, και την επίδραση αυτών στους επικονιαστές της και τα προϊόντα τους. Για το σκοπό αυτόν ελήφθησαν δείγματα, τα οποία αφορούν μέλισσες, βομβίνους και μέλι, το χρονικό διάστημα από τα τέλη Ιουνίου έως τα μέσα Οκτωβρίου του 2018 στην ευρύτερη περιοχή των Χανίων, Κρήτης, έπειτα από τις εφαρμογές που πραγματοποιήθηκαν σε ποικιλία ελιάς Κορωνέικη, για την ανίχνευση των υπολειμμάτων ουσιών και μεταβολιτών τους που ανήκουν σε ομάδες με διαφορετικές χημικές ιδιότητες. Αυτές οι ουσίες είναι τα  $\beta$ -Cyfluthrin και  $\lambda$ -Cyhalothrin τα οποία ανήκουν στην ομάδα των πυρεθροειδών και το dimethoate και ο μεταβολίτης του, το omethoate που ανήκουν στην ομάδα των οργανοφωσφορικών.

Η τεχνική κατεργασίας δειγμάτων που εφαρμόστηκε είναι η QuEChERS με τις τροποποιήσεις όπως προτάθηκαν από τους Wiest L. et al., ώστε να εκχυλιστούν και να απομονωθούν οι προσδιοριζόμενες ουσίες. Τα δείγματα ακολούθως αναλύθηκαν μέσω ενός συστήματος υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης συζευγμένο με ένα τετραπολικό φασματόμετρο μάζας (High Performance Liquid Chromatography, HPLC-MS/MS) προκειμένου για τον προσδιορισμό των οργανοφωσφορικών και μέσω ενός συστήματος GC-MS/MS για τον προσδιορισμό των πυρεθροειδών.

Στην παρούσα εργασία εφαρμόστηκαν επικυρωμένες μέθοδοι του εργαστηρίου για τον προσδιορισμό των υπολειμμάτων γεωργικών φαρμάκων και των μεταβολιτών τους. Βάσει της οδηγίας 2002/657/EK της Ευρωπαϊκής Ένωσης, στην οποία αναφέρονται η επίδοση των αναλυτικών μεθόδων και η ερμηνεία των αποτελεσμάτων τους, πραγματοποιήθηκε η ταυτοποίηση και η επιβεβαίωση των αναλυτών στα δείγματά μας. Η κύρια κατευθυντήρια οδηγία η οποία ακολουθήθηκε ήταν η οδηγία SANTE/11813/2017. Τα όρια ποσοτικοποίησης της μεθόδου (ΟΠ, LOQ), ορίστηκαν ως τα χαμηλότερα επίπεδα συγκέντρωσης των δραστικών ουσιών με τα οποία έχουν φορτιστεί τυφλά δείγματα των υποστρωμάτων (μέλι, μέλισσες, βομβίνες) τα οποία πληρούν τα σχετικά κριτήρια ορθότητας και πιστότητας. Η ορθότητα ολόκληρης της μεθόδου αξιολογήθηκε σε δείγματα εμβολιασμένα με τις δραστικές ουσίες της μεθόδου και υπολογίστηκε με μετρήσεις της ανάκτησης επαναλαμβανόμενων μετρήσεων σε τρία επίπεδα συγκέντρωσης εκφραζόμενη ως ποσοστιαία ανάκτηση (%). Οι επιδράσεις της μήτρας όπως προσδιορίστηκαν, αποδείχθηκαν αμελητέες.

Κατεργάστηκαν και αναλύθηκαν 73 δείγματα: 35 δείγματα μελισσών, 8 δείγματα βομβίνων και 30 δείγματα μελιού. Σε ότι αφορά το μέλι η κυρίαρχη ανίχνευση αφορούσε το dimethoate και το μεταβολίτη του omethoate. Για τις δύο αυτές δραστικές ουσίες δεν έχουν θεσπιστεί MRL. Για όλες τις δραστικές ουσίες που ανιχνεύθηκαν στο μέλι (δείγματα που συλλέχθηκαν έπειτα και των δύο τρόπων εφαρμογής) τα ΟΠ (LOQ) ήταν κατώτερα των MRL και δεν καταγράφηκε σημαντική διακύμανση στα επίπεδα συγκέντρωσης των ουσιών αυτών. Σε ότι αφορά τις μέλισσες και τους βομβίνους, τα ΟΠ ήταν κατώτερα των μέσων θανατηφόρων δόσεων (LD50) δια κατάποσης και δια επαφής. Στους βομβίνους (αν και ο αριθμός δειγμάτων ήταν μικρός) οι υψηλότερες συγκεντρώσεις παρατηρήθηκαν σε δείγματα που συλλέχθηκαν σε αγροτεμάχια στα οποία είχαν γίνει δολωματικοί ψεκασμοί. Στις μέλισσες ανιχνεύθηκαν όλες

οι δραστικές ουσίες (το β-cyfluthrin δεν ανιχνεύτηκε στους βομβίνους και στο μέλι), ωστόσο και ο αριθμός δειγμάτων τους ήταν μεγαλύτερος.

Συμπερασματικά, αν και η ελαιοκαλλιέργεια δεν θεωρείται η πιο ελκυστική ανθοφορία για τις μέλισσες, στην εργασία αυτή αποτυπώθηκε η αλληλεπίδραση των ψεκασμών σε ελαιόδενδρα σε σχέση με τις μέλισσες, τους βομβίνους και το μέλι, ως το κατεξοχήν προϊόν της κυψέλης καθώς και η ανάγκη παρακολούθησης του πληθυσμού των μελισσών, συμπεριλαμβανομένων και των άγριων μελισσών, όταν γειτνιάζουν σε ελαιοκαλλιέργειες, και ειδικά αν στα παρακείμενα αγροτεμάχια δεν υπάρχουν περισσότερες ελκυστικές ανθοφορίες.

# ΠΙΝΑΚΑΣ ΣΥΝΤΜΗΣΕΩΝ ΟΡΩΝ

Σύντμηση	Ξενόγλωσσος όρος	Ελληνικός όρος
ACh	Acetylcholinesterase	Ακετυλοχολινεστεράση
μm	micrometre	μικρόμετρο
μL	microliter	μικρόλιτρο
ACN	acetonitrile	ακετονιτρίλιο
ESI	Electrospray Ionization	Ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό ή ηλεκτροδιάχυση
GC	Gas Chromatography	Αέρια Χρωματογραφία
EI	Electron impact	Πρόσκρουση ηλεκτρονίων
g	gram	Γραμμάριο
HPLC	High Performance Liquid Chromatography	Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής απόδοσης
LC	Liquid Chromatography	Υγρή Χρωματογραφία
LOD	Limit of detection	Όριο ανίχνευσης
LOQ	Limit of quantitation	Όριο ποσοτικοποίησης
mg	milligram	Χιλιοστογραμμάριο
min	minute	Λεπτό της ώρας
mL	milliliter	Χιλιοστόλιτρο
mM	millimolarity	
MRM	Multiple Reaction Monitoring	Παρακολούθηση πολλαπλών αντιδράσεων ή μεταπτώσεων
MeOH	Methanol	Μεθανόλη
MS	Mass Spectrometry	Φασματομετρία Μάζας
MS/MS	Tandem Mass Spectrometry	Δίδυμη ή Διαδοχική Φασματομετρία Μάζας
ECD	Electron Capture Detector	Ανιχνευτής Σύλληψης Ηλεκτρονίων

ppb	Parts per billion	Μέρη ουσίας ανά δισεκατομμύριο
ppm	Parts per million	Μέρη ουσίας ανά εκατομμύριο
PSA	Primary Secondary Amine	Πρωτοταγής δευτεροταγής αμίνη
rpm	Rounds per minute	Στροφές ανά λεπτό
C18	Octadecyl silane	Οκταδεκυλσιλάνιο
EFSA	European Food Safety Authority	Ευρωπαϊκή Αρχή Ασφάλειας Τροφίμων
‘’	Sec	Δευτερόλεπτο
Q1	First quadrupole	Πρώτο τετράπολο



## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

#### 1. ΕΛΙΑ ΚΑΙ ΕΛΑΙΟΔΕΝΤΡΟ



Εικόνα 1.1.: δέντρο ελιάς (πηγή: symAgro.com)

##### 1.1. Ιστορικά στοιχεία

Η ιστορία της Μεσογείου συνδέεται στενά με το δέντρο της ελιάς. Το ήπιο κλίμα που επικρατεί στο χώρο αυτό ευνόησε τη διάδοση και καλλιέργειά της. Από τα προϊστορικά χρόνια η ελιά συμβιώνει με τους λαούς της Μικράς Ασίας, της Συρίας, της Παλαιστίνης, του Ελλαδικού χώρου, της Κύπρου, της Ιταλίας, της Σικελίας, της Ιβηρικής Χερσονήσου, της Νότιας Γαλλίας και της Βόρειας Αφρικής.

Πρόσφατες έρευνες στα νησιά του Αιγαίου αποκάλυψαν φύλλα ελιάς ηλικίας 60.000 ετών. Σαν αυτοφυές δέντρο η αγριελιά πρωτοεμφανίστηκε στην ανατολική Μεσόγειο. Η καλλιέργεια της γης, όπως ξεκίνησε από τον ευρύτερο χώρο της Μέσης Ανατολής, συμπεριλαμβάνει και την καλλιέργεια της ελιάς, και συγκεκριμένα της ποικιλίας που δίνει το λάδι.

Το λάδι παράγεται από τη σύνθλιψη των καρπών της ελιάς και για αυτό χρησιμοποιήθηκαν αρχικά λίθινοι τριπτήρες, γουδιά και χειρόμυλοι, όμοιοι με αυτούς της άλεσης των σιτηρών.

Πιθανότατα, οι Φοίνικες, λαός της ανατολικής Μεσογείου, διέδωσαν την καλλιέργεια της ελιάς στην Κρήτη και στα παράλια της Ελλάδος και αργότερα οι Έλληνες στους λαούς της Δυτικής Μεσογείου. Οι μαύρες και πράσινες ελιές και το πολύτιμο για τη διατροφή ελαιόλαδο, παράγονται από την *Olea europaea* L, την ελιά των ελαιοπαραγωγών χωρών της Ευρώπης, της Ελλάδος, της Ισπανίας, της Ιταλίας και της Γαλλίας, στηρίζοντας έτσι την οικονομία των χωρών αυτών. Επιπλέον, το λάδι χρησιμοποιούνταν αρχικά στην υγιεινή του σώματος πριν το σαπούνι. Στα λυχάρια για τον φωτισμό χρησιμοποιούσαν λάδι και για τη θέρμανση χρησιμοποιούσαν τον πυρήνα των καρπών της ελιάς. Το ξύλο της χρησιμοποιείται από την αρχαιότητα για την κατασκευή εργαλείων, επίπλων και σαν οικοδομικό υλικό. Τέλος, το φύλλωμά της αποτελεί πολύτιμο λίπασμα.

Η ελιά, αποτελεί στοιχείο του πολιτισμού, σύμβολο της ειρήνης και έπαθλο των νικητών στους Ολυμπιακούς αγώνες, επηρέασε με το πέρασμα του χρόνου τα έθιμα, τις παραδόσεις, τα τραγούδια, τις εικαστικές τέχνες, τις τέχνες του λόγου, τη λατρεία των θρησκειών όλων των λαών που συνδέονται μαζί της. (Μουσείο Ελιάς Κυκλάδων <http://www.musioelias.gr/el/node/15> )

## 1.2. Μορφολογία της ελιάς

Η ελιά, *Olea europaea* L. ανήκει στην οικογένεια Oleaceae. Άλλα σημαντικά γένη της οικογένειας είναι τα *Ligustrum*, *Jasminum*, *Fraxinus*. Το είδος *Olea europaea* διακρίνεται στην καλλιεργούμενη ποικιλία *Olea europaea* var. *sativa* και στην άγρια ποικιλία *Olea europaea* var. *oleaster* ή *Olea europaea* var. *sylvestris* (Rhizopoulou, 2007).

Ο φλοιός του **κορμού** της ελιάς είναι τεφροπράσινος στα νεαρά δέντρα. Καθώς περνούν τα χρόνια παίρνει χρώμα τεφρό και σκοτεινό, ρυτιδιάζει και εμφανίζονται γόγγροι, διαφόρου μεγέθους υπερπλασίες που δημιουργούνται από την συγκέντρωση θρεπτικών ουσιών και φυτορμονών. Το ξύλο είναι κιτρινωπό προς τα έξω και σκοτεινό προς το εσωτερικό, σκληρό και ανθεκτικό. Πολλές φορές προσβάλλεται από μύκητες οι οποίοι το καταστρέφουν, δημιουργώντας κοιλότητες μέσα στον κορμό και τα κλαδιά. Οι δακτύλιοι δεν είναι ευκρινείς λόγω της ακανόνιστης αύξησης που παρατηρείται στο δέντρο της ελιάς.

Το **ριζικό σύστημα** στην ελιά είναι κυρίως επιφανειακό (15-70 εκατοστά) και αναπτύσσεται παράλληλα στην επιφάνεια του εδάφους, εν αντιθέσει με τα νεαρά δεντρύλλια όπου παρατηρείται κατακόρυφη ανάπτυξη. Φυσικά σημαντικό ρόλο διαδραματίζει ο τύπος και η γονιμότητα του εδάφους. Έτσι σε άγονα εδάφη και εδάφη μη αρδευόμενα, παρατηρείται βαθύτερο ριζικό σύστημα σε σχέση με περιοχές που το έδαφος είναι πλούσιο σε θρεπτικά στοιχεία και αρδευόμενο. Όταν το έδαφος είναι ξερό και πετρώδες οι ρίζες εισχωρούν σε βάθος μεγαλύτερο του ενός μέτρου, φτάνοντας ως και τα 6 μέτρα, για ανεύρεση υγρασίας και θρεπτικών στοιχείων. Το χαρακτηριστικό αυτό καθιστά την ελιά ανθεκτική στην ξηρασία. Σε τέτοια εδάφη η ελιά επεκτείνει τις ρίζες της προς πολλές κατευθύνσεις και υπολογίζεται πως οι ρίζες μπορούν να καλύψουν ακόμα και 7-8 φορές μεγαλύτερη επιφάνεια από τη φυλλώδη επιφάνειά της, ενώ στα μη πετρώδη εδάφη συνήθως είναι μόνο 3-4 φορές μεγαλύτερη.

Η ελιά νωρίς την άνοιξη, στους **βλαστούς** της, έχει **οφθαλμούς** που θα δώσουν νέους βλαστούς (βλαστοφόροι) και οφθαλμούς που θα δώσουν ταξιανθίες (ανθοφόροι). Αρχικά, στη νέα (ετήσια) βλάστηση, όλοι οι οφθαλμοί είναι ίδιοι (βλαστοφόροι) και από αυτούς κάποιοι διαφοροποιούνται αργότερα σε ανθοφόρους. Οι ανθοφόροι ξεχωρίζουν από τους βλαστοφόρους δύσκολα, και μόνο σε προχωρημένο στάδιο διαφοροποίησης (στις αρχές της επόμενης άνοιξης, όταν ξεκινάει η νέα βλάστηση). Οι βλαστοφόροι είναι πιο μικροί και πιο στενοί σε σχέση με τους ανθοφόρους που είναι πιο εξογκωμένοι. Οι βλαστοί μέτριας ζωηρότητας εξελίσσονται συνήθως σε καρποφόρους, ενώ οι πολύ ζωηροί βλαστοί (λαίμαργοι) εξελίσσονται σε ξυλοφόρους. Όταν υπάρχουν πολλοί λαιμαργοί βλαστοί συνήθως ακολουθεί ακαρπία. Έτσι η ελιά ανθοφορεί και καρποφορεί στους βλαστούς της προηγούμενης χρονιάς, οι οποίοι ανάλογα διακρίνονται σε:

- ξυλοφόρους (έχουν μόνο βλαστοφόρους οφθαλμούς)
- καρποφόρους (έχουν μόνο ανθοφόρους οφθαλμούς)
- μικτούς (έχουν και τα δύο είδη οφθαλμών).

Οι κορυφαίοι μικτοί οφθαλμοί, λίγο πριν ξεκινήσει η νέα βλάστηση, μετατρέπονται σε φυλλοφόροι επάκριοι για την προέκταση του βλαστού, και οι μασχαλιαίοι μικτοί σε ανθοφόροι ή φυλλοφόροι. Η διαμόρφωση σε ανθοφόρους γίνεται στο τέλος του χειμώνα προς τις αρχές της άνοιξης, περίπου 2,5 μήνες πριν την ανθοφορία. Ανάλογα με την ποικιλία, τα κλωνάρια

έχουν κατεύθυνση όρθια (ορθόκλαδα δέντρα), άλλα πλάγια (πλαγιόκλαδα) και άλλα επικλινή (κρεμόκλαδα δέντρα). (Καλλιέργεια της ελιάς, υπ.Γεωργίας Κύπρου, 2014)



Εικόνα 1.2: τα φύλλα της ελιάς

Τα **φύλλα** της ελιάς έχουν χρώμα στην πάνω επιφάνεια τεφροπράσινο και στην κάτω μπρουτζοπράσινο προς μολυβδοπράσινο. Η πάνω επιφάνεια είναι δερματώδης με παχιά εφυμενίδα, ενώ τα στομάτια στην κάτω επιφάνεια είναι μικρά, βυθισμένα και καλύπτονται με πυκνό χνούδι. Η κατασκευή αυτή των φύλλων που συμβάλλει στον περιορισμό της διαπνοής και της απώλειας υγρασίας, βοηθά την ελιά στο να έχει καλή αντοχή σε συνθήκες ξηρασίας με υψηλή θερμοκρασία και ανέμους. Τα φύλλα της είναι στενά, λογχοειδή, μακρουλά ή πλατιά, ανάλογα με την ποικιλία. Βγαίνουν στο βλαστό συνήθως δύο-δύο και το ένα απέναντι από το άλλο και ζουν 2-3 χρόνια (Κυριτσάκης Α., 2007).

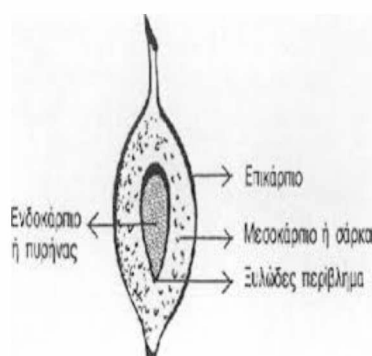


Εικόνα 1.3: το άνθος της ελιάς (πηγή mapio.net)

Τα **άνθη** είναι μικρά, κοντόμισχα, κιτρινόλευκα και φέρονται σε βοτρυώδεις ταξιανθίες στις μασχάλες αντίθετων φύλλων και σε βλαστούς της προηγούμενης βλαστικής περιόδου, αλλά και από λανθάνοντες οφθαλμούς που βρίσκονται σε βλαστούς ηλικίας 1-2 ετών. Ο κάλυκας και η στεφάνη σχηματίζουν ένα κώδωνα, ο οποίος φέρει στο εσωτερικό του δυο βραχείς στήμονες και ένα ύπερο. Ο ύπερος αποτελείται από μια δίχωρη ωοθήκη, ένα βραχύ στύλο και ένα διπλό

κεφαλωτό στίγμα. Σε όλα τα άνθη δεν είναι αναπτυγμένα όλα τα μέρη. Υπάρχουν τέλεια άνθη (με αναπτυγμένους στήμονες και ύπερο) και ατελή άνθη (με ατροφικό ύπερο). Τα ατελή δεν μπορούν να γονιμοποιηθούν και να δώσουν καρπό. Η αναλογία τέλειων και ατελών ανθέων ποικίλλει από ποικιλία σε ποικιλία αλλά και από χρονιά σε χρονιά. Η παρουσία ατελών ανθέων οφείλεται για παράδειγμα στην έλλειψη επαρκούς φυλλώματος. Σε μία ελιά όσο λιγότερα φύλλα υπάρχουν τόσο περισσότερα ατελή άνθη παρατηρούνται. Σε περιοχές με υψηλότερες θερμοκρασίες η ελιά ξεκινά να ανθίζει τον Απρίλιο ενώ στις πιο ψυχρές περιοχές κατά τις αρχές Ιουνίου, πάντα ανάλογα με την ποικιλία.

### 1.3 Ο ελαιόκαρπος



Εικόνα 1.4: Ο καρπός της ελιάς, Ζακυνθινός, 2010

#### Γενικά

Ο σχηματισμός του ελαιόκαρπου ξεκινά αμέσως μετά τη γονιμοποίηση των ανθέων το Μάιο, ενώ ωριμάζει από το φθινόπωρο μέχρι το χειμώνα (Garrido Fernandez et al., 1997; Αλυγιζάκης, 1982). Ο καρπός της ελιάς μορφολογικά είναι δρύπη και αποτελείται από τον εξωτερικό φλοιό (περικάρπιο), το σαρκώδες μέρος (μεσοκάρπιο) όπου γίνεται η ελαιοποίηση και τον πυρήνα (ενδοκάρπιο). Στο εξωτερικό του ενδοκαρπίου παρατηρούνται χαρακτηριστικές αυλακώσεις που καλούνται γλυφές, ενώ στο εσωτερικό του βρίσκεται το σπέρμα το οποίο αποτελείται από την επιδερμίδα, το ενδοσπέρμιο, τις κοτυληδόνες και το έμβρυο. Το χρώμα του καρπού, ανάλογα της ποικιλίας και της ωριμότητάς του μεταβάλλεται από πράσινο σε ιώδες μέχρι μελανοϊώδες. Το σχήμα του καρπού εξαρτάται από την ποικιλία. Έτσι υπάρχουν καρποί σφαιρικοί, ωοειδείς, ελλειψοειδείς, κτλ. Το μέγεθος του καρπού επίσης εξαρτάται κυρίως από την ποικιλία και το φόρτωμα των ελαιόδεντρων, καθώς επίσης και από άλλους παράγοντες όπως η σύσταση του εδάφους, οι καλλιεργητικές φροντίδες, οι κλιματολογικές συνθήκες (π.χ. ανομβρία), κτλ. (Αλυγιζάκης, 1982).

#### Αύξηση και ωρίμανση του ελαιόκαρπου

Ο καρπός αυξάνεται έως ότου αποκτήσει σταθερό βάρος και ακολουθεί έπειτα το στάδιο της ωρίμανσής του. Η ωρίμανση του καρπού είναι μια αργή διαδικασία που μπορεί να διαρκέσει για αρκετούς μήνες και εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, όπως το γεωγραφικό πλάτος της περιοχής που καλλιεργείται, την ποικιλία, την κατάσταση υγείας, την ηλικία του ελαιόδεντρου



και τη διαθεσιμότητα του νερού, τη θερμοκρασία, το φως, τη μέθοδο καλλιέργειας και τη χρήση λιπασμάτων (π.χ τα φωσφορούχα λιπάσματα) (Kiritsakis, 1990 & Boskou, 1996)

Τα άγονα υγρά και αργιλώδη εδάφη, φτωχά σε κάλιο και φωσφορούχα κάνουν την αύξηση και ωρίμανση του καρπού σχετικά δύσκολη. Αντίθετα, στα γόνιμα εδάφη, πλούσια σε ασβεστούχες ύλες, η αύξηση και ωρίμανση του καρπού διαρκεί και ολοκληρώνεται σε συντομότερο χρόνο.

Το ενδοκάρπιο (πυρήνας) είναι το πρώτο τμήμα του καρπού που αναπτύσσεται και ακολουθεί με γρήγορο ρυθμό η ανάπτυξη της σάρκας. Το ενδοκάρπιο και το μεσοκάρπιο του καρπού αναπτύσσονται από το Μάιο μέχρι και το δεύτερο δεκαήμερο του Ιουλίου, ή και αργότερα. Η ξυλοποίηση των ιστών του ενδοκαρπίου πραγματοποιείται βαθμιαία και σύμφωνα με ενδείξεις, ξεκινά από τα στρώματα που είναι κοντά στην κεντρική κοιλότητα και προχωρά προς την επιφάνεια. Όταν διαμορφώνεται το ξυλώδες ενδοκάρπιο, το σαρκώδες μέρος, δηλαδή το μεσοκάρπιο, καταλαμβάνει ένα λεπτό επιφανειακό στρώμα. Όταν ολοκληρωθεί η ανάπτυξη του ενδοκαρπίου αρχίζει η ανάπτυξη του μεσοκαρπίου που ολοκληρώνεται το φθινόπωρο με χειμώνα (Ζακυνθινός, 2010). Το βάρος του καρπού αυξάνεται στο διάστημα Οκτωβρίου-Νοεμβρίου, αλλά στη συνέχεια μειώνεται εξαιτίας της πτώσης της υγρασίας. Στο τέλος του Ιουλίου ξεκινά η συσσώρευση του ελαίου και το χειμώνα η περιεκτικότητα σε έλαιο φτάνει στο μέγιστο. Το έλαιο συγκεντρώνεται κυρίως στο περικάρπιο (96-98%) (Boskou, 1996). Όσο προχωράει η ωρίμανση το χρώμα του μεσοκαρπίου και του εξωκαρπίου (φλοιού) από πράσινο μεταβάλλεται και καταλήγει σε ιώδες μέχρι μελανοϊώδες ενώ η χλωροφύλλη εξαφανίζεται από τα κύτταρα του καρπού. Το σάρκωμα προοδευτικά μαλακώνει και ο φλοιός γίνεται στιλνός. Η εκατοστιαία περιεκτικότητα του ελαιόκαρπου σε σάκχαρα είναι αρκετά υψηλή στο διάστημα Μάιος-Ιούνιος, πάνω από 10%, μειώνεται όμως προοδευτικά φτάνοντας σε χαμηλά επίπεδα 1-2% στην πλήρη ωρίμανση. Επομένως, η μείωση των σακχάρων αποτελεί ενδεικτικό στοιχείο του βαθμού ωρίμανσης του καρπού. (Αλυγιζάκης, 1982). Από τον Ιούνιο, στον ελαιόκαρπο παρατηρείται μικρή περιεκτικότητα σε έλαιο και από τα μέσα Ιουλίου αρχίζει βαθμιαία η αύξηση της περιεκτικότητας αυτού στο σάρκωμα και στο σπέρμα. Από τον Αύγουστο, η περιεκτικότητα σε έλαιο στο σπέρμα σταθεροποιείται. Κατά το φθινόπωρο, οπότε και ο καρπός είναι σε μέγιστο βαθμό ενυδατωμένος σημειώνεται αύξηση της εκατοστιαίας περιεκτικότητας ελαίου και μετά παρατηρείται μείωση. Αργότερα, σημειώνεται και πάλι αύξηση της εκατοστιαίας περιεκτικότητάς του. Οπότε η αύξηση της περιεκτικότητας του καρπού σε έλαιο αποτελεί χαρακτηριστικό της ωρίμανσης του καρπού. Το άζωτο κατά την ανάπτυξη του καρπού αυξάνεται στο σάρκωμα και στο σπέρμα και ελαττώνεται στο ξυλώδες ενδοκάρπιο(Αλυγιζάκης, 1982).

#### Χημική σύσταση του ελαιόκαρπου

Η χημική σύσταση των καρπών της ελιάς ποικίλλει σημαντικά από ποικιλία σε ποικιλία και εξαρτάται από το στάδιο ανάπτυξης και το βαθμό ωριμότητας του ελαιόκαρπου. Επειδή ο καρπός της ελιάς χαρακτηρίζεται από σχετικά υψηλή περιεκτικότητα σε λιπαρά, η οποία αυξάνεται καθώς προχωρά η ωρίμανση, οι ώριμες ελιές περιέχουν περισσότερα λιπαρά από τις πράσινες ελιές. Η συγκέντρωση των σακχάρων στις ελιές, μειώνεται καθώς προχωρά η ωρίμανση. Οι νωπές ελιές έχουν χαρακτηριστική συγκέντρωση σε διαιτητικές ίνες (κυτταρίνη, ημικυτταρίνη, λινίνη), οι οποίες κυμαίνονται από 0,3 έως 0,6%. Χαμηλή είναι η συγκέντρωση των ιχνοστοιχείων ενώ η συγκέντρωση σε κάλιο είναι αυξημένη. Επίσης, ο καρπός της ελιάς

περιέχει ένα σημαντικό ποσοστό φαινολικών ενώσεων που κυμαίνονται από 3 έως 6% επί ξηράς ουσίας. Η ύπαρξη χλωροφύλλης δίνει το αρχικό πράσινο χρώμα του καρπού ενώ το ρόδινο έως πορφυρό χρώμα που έχουν οι ώριμες ελιές οφείλεται στο σχηματισμό των ανθοκυανών. Τέλος, οι ελιές περιέχουν μια πικρή ουσία, την ελευρωπαΐνη, η οποία τις κάνει ακατάλληλες προς κατανάλωση, αν δεν προηγηθεί κάποια επεξεργασία. Η συγκέντρωση αυτής της ένωσης μειώνεται με το χρόνο ωρίμανσης (Μπαλατσούρας 1995). Για την ακρίβεια, οι πλήρως ώριμες ελιές συγκεκριμένων ποικιλιών, παρουσιάζουν χαμηλή συγκέντρωση ελευρωπαΐνης οπότε μπορούν να καταναλωθούν άμεσα.

#### 1.4. Ελαιόλαδο

Το σπουδαιότερο συστατικό του ελαιόκαρπου είναι το ελαιόλαδο. Το ελαιόλαδο κυμαίνεται, για τον ελαιόκαρπο των ποικιλιών που παράγουν επιτραπέζιες ελιές, από 18-25% περίπου σε σχέση με το βάρος του ώριμου καρπού. Το ελαιόλαδο αποτελείται από τριγλυκερίδια και επί πλέον από μικρές ποσότητες λιποδιαλυτών σε αυτό ουσιών. Η ποσότητα των λιποδιαλυτών ουσιών εξαρτάται από τον τρόπο εξαγωγής του ελαιόλαδου από τον ελαιόκαρπο. Έτσι, το έλαιο που λαμβάνεται με εκχύλιση μέσω οργανικών διαλυτών περιέχει μεγαλύτερες ποσότητες λιποδιαλυτών ουσιών από εκείνο που λαμβάνεται στα ελαιοτριβεία (με μηχανική εξαγωγή). Τα λιποδιαλυτά αυτά συστατικά χωρίζονται σε δύο κατηγορίες: στα ασαπωνοποιήτα, όπως είναι υδρογονάνθρακες, λιπαρές αλκοόλες κ.α., και στα σαπωνοποιήσιμα, όπως είναι τα φωσφατίδια, η χλωροφύλλη και τα ελεύθερα λιπαρά οξέα. Στο παρθένο ελαιόλαδο που εξάγεται αποκλειστικά με μηχανικό τρόπο από τον ελαιόκαρπο (συμπίεση ή φυγοκέντρωση) τα ασαπωνοποιήτα συστατικά κυμαίνονται από 0,5 μέχρι 1,5%, ενώ στα έλαια που εξάγονται με οργανικούς διαλύτες καθώς και στα πυρηνέλαια (που λαμβάνονται με εκχύλιση με οργανικούς διαλύτες από τα υπολείμματα του ελαιόκαρπου μετά τη μηχανική εξαγωγή του ελαιόλαδου) τα ασαπωνοποιήτα συστατικά φθάνουν μέχρι 2,5% (Αλυγιάκης, 1982).

Το ελαιόλαδο αποτελεί ένα από τα βασικά συστατικά της Μεσογειακής διατροφής. Υπάρχουν αυξανόμενες ενδείξεις ότι μπορεί να έχει μεγάλα οφέλη για την υγεία, όπως η μείωση του κινδύνου στεφανιαίας νόσου, την πρόληψη ορισμένων μορφών καρκίνου κ.ά. Το παρθένο ελαιόλαδο φαίνεται να είναι ένα λειτουργικό τρόφιμο με διάφορα συστατικά όπως πολυφαινολικές ενώσεις και μονοακόρεστα λιπαρά οξέα, τα οποία μπορεί να έχουν θρεπτικά οφέλη. Είναι γνωστό ότι η αυξημένη κατανάλωση μονοακόρεστων λιπαρών οξέων αντί των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων, μειώνει τον κίνδυνο της αθηροσκλήρωσης (Nakbi et al., 2010).

Το ελαιόλαδο διακρίνεται σε βρώσιμο και μη βρώσιμο και ταξινομείται σε διάφορες κατηγορίες βάσει της επεξεργασίας που έχει υποστεί και της οξύτητας που διαθέτει.

#### 1.5. Ποικιλίες

Το 1998 έγινε μία προσπάθεια ταξινόμησης των ποικιλιών από την FAO (Food and Agriculture Organization) η οποία εντόπισε 538 ποικιλίες ελιών ελαιοπαραγωγής και επιτραπέζιων με 1300 συνώνυμα. Η παραπάνω διάκριση και ταξινόμηση βασίζεται στα μορφολογικά χαρακτηριστικά του δένδρου, του πυρήνα και του καρπού καθώς και στην περιγραφή των φύλλων και των ανθέων (Γρηγοριάδου 2003). Επίσης στηρίζεται στην ευαισθησία και την

προσαρμοστικότητα της κάθε ποικιλίας στις εδαφοκλιματικές συνθήκες, την αντοχή της σε εχθρούς και ασθένειες, καθώς και την περιεκτικότητα των καρπών σε λάδι και το χρόνο ωρίμανσής τους (Mulas, 1999). Τέλος, κριτήριο αποτελεί και ο προορισμός χρήσης του καρπού τους. Έτσι, πέρα από το κλασικό διαχωρισμό των καλλιεργούμενων ποικιλιών, ανάλογα με το βάρος του καρπού, σε μικρόκαρπες (1,2 – 2,6 g), μεσόκαρπες (2,7 – 4,2 g) και μεγαλόκαρπες (4,3 – 10,5 g) έχουμε και το διαχωρισμό ανάλογα με τη χρήση του καρπού της.



Εικόνα 1.5: ελιά καλαμών, πηγή: [www.bioarmonia.gr](http://www.bioarmonia.gr)

#### 1.6. Παραγωγή και νομοθεσία

Η Ελλάδα, μετά την Ισπανία, Τυνησία και Ιταλία, βρίσκεται σε 4η θέση παγκοσμίως στην καλλιέργεια ελιάς, με πάνω από 170 εκατομμύρια ελαιόδεντρα σε περίπου 11,6 εκατομμύρια στρέμματα γης, βάσει πρόσφατης αναφοράς του Διεθνούς Συμβουλίου Ελαιολάδου (International Olive Council 2010). Στον τομέα του ελαιολάδου, η Ελλάδα με μια μέση ετήσια παραγωγή τα τελευταία χρόνια γύρω στους 380 (300-435) χιλιάδες τόνους, έρχεται 3η μετά την Ισπανία και την Ιταλία. Στον τομέα της επιτραπέζιας ελιάς, με μια μέση ετήσια παραγωγή 108 (90-120) χιλιάδων τόνων, έρχεται 5η μετά την Ισπανία, Αίγυπτο, Τουρκία και Συρία. Σε παγκόσμια κλίμακα η παραγωγή ανέρχεται πάνω από 900 εκατομμύρια ελαιόδεντρα που περιλαμβάνονται σε περίπου 10 εκατομμύρια εκτάρια από τα οποία το 95% βρίσκεται στην λεκάνη της Μεσογείου (Walton, 1995). Η κατανάλωση ελαιολάδου όσο και επιτραπέζιας ελιάς αυξάνεται σταθερά (Γιαννοπολίτης, 2009). Η παραγωγή επιτραπέζιας ελιάς και ελαιολάδου συνεισφέρει σημαντικά στην εθνική οικονομία της Ελλάδας. Για τον λόγο αυτό συστάθηκε ένας διεθνής οργανισμός, το Διεθνές Συμβούλιο Ελαιολάδου, το οποίο διαχειρίζεται την προώθηση, τους εμπορικούς κανονισμούς και διάφορες άλλες διαδικασίες που σχετίζονται με τις επιτραπέζιες ελιές και το ελαιόλαδο. Για λόγους διασφάλισης της αναγνώρισης των ιδιαίτερων χαρακτηριστικών που έχουν ορισμένα προϊόντα, όπως οι επιτραπέζιες ελιές κάποιων περιοχών, η Ευρωπαϊκή Κοινότητα δημιούργησε το 1992 συστήματα, όπως την ΠΟΠ και την ΠΓΕ ([www.minagric.gr](http://www.minagric.gr)). Αυτά τα συστήματα ανάπτυξης και προστασίας ειδών διατροφής έχουν σαν στόχο να βοηθήσουν τον καταναλωτή δίνοντας πληροφορίες σχετικά με τον ιδιάζοντα χαρακτήρα των προϊόντων και να προστατεύσουν τα ονόματα προϊόντων από παράνομη χρήση και απομιμήσεις.

ΠΟΠ – Προστατευόμενη Ονομασία Προέλευσης: το όνομα μιας περιοχής, το οποίο χρησιμοποιείται για την περιγραφή ενός γεωργικού προϊόντος ή ενός τροφίμου που κατάγεται

από τη συγκεκριμένη περιοχή, του οποίου η ποιότητα ή τα χαρακτηριστικά οφείλονται αποκλειστικά στο ιδιαίτερο γεωγραφικό περιβάλλον που περιλαμβάνει τους εγγενείς φυσικούς και ανθρώπινους παράγοντες, του οποίου η παραγωγή, η μεταποίηση και η επεξεργασία πραγματοποιούνται στην οριοθετημένη γεωγραφική περιοχή.

ΠΠΕ – Προστατευόμενη Γεωγραφική Ένδειξη: το όνομα μιας περιοχής, το οποίο χρησιμοποιείται για την περιγραφή ενός γεωργικού προϊόντος ή τροφίμου που κατάγεται από την συγκεκριμένη περιοχή, του οποίου η ποιότητα ή άλλα χαρακτηριστικά μπορούν να αποδοθούν στην εν λόγω γεωγραφική καταγωγή, του οποίου η παραγωγή ή /και η μεταποίηση ή/και η επεξεργασία πραγματοποιούνται στην οριοθετημένη γεωγραφική περιοχή.

Επίσης, έχουν αναγνωριστεί και κατοχυρωθεί επιτραπέζιες ελιές και ελαιόλαδα κάποιων περιοχών της Ελλάδας, με αυτές τις ενδείξεις.

### 1.7. Ασθένειες και εχθροί της ελιάς

Η ελιά είναι ευάλωτο δέντρο σε μύκητες, βακτήρια και έντομα. Ένας μεγάλος αριθμός ασθενειών κυρίως μυκητολογικής προέλευσης, και η δράση παρασίτων, εντόμων, πτηνών αλλά και άλλων ζώων οδηγούν στη διατάραξη της ευρωστίας και παραγωγικότητάς της.

#### Ασθένειες

##### Κυκλοκόνιο (μύκητας *Cycloconium oleaginum*)



Εικόνα 1.8: κυκλοκόνιο στην ελιά, πηγή: [www.froutonea.gr](http://www.froutonea.gr)

Τα ελαιόδεντρα εξασθενούν σε περίπτωση προσβολής τους από την ασθένεια, εξαιτίας εκτεταμένης φυλλόπτωσης και μείωση της παραγωγής μέχρι ακαρπίας. Προσβάλλει τα φύλλα, τους μίσχους των φύλλων και τους ποδίσκους των ταξιανθιών. Χαρακτηριστικό σύμπτωμα είναι οι κηλίδες στα φύλλα με διάμετρο 2-12mm. Συνθήκες κατάλληλες για προσβολή αποτελούν η υψηλή υγρασία και θερμοκρασία 7-30°C με άριστη θερμοκρασία 16-20°C.

Αντιμετώπιση: Βασίζεται στην εκτέλεση προληπτικών ψεκασμών κυρίως με χαλκούχα (Βορδιγάλειο πολτό). Συνήθως διενεργούνται δύο ψεκασμοί. Ο πρώτος αρχές φθινοπώρου πριν την έναρξη των βροχών και ο δεύτερος αρχές της άνοιξης.



### Γλοιοσπόριο (μύκητας *Gleosporium olivarum*)



Εικόνα 1.9: γλοιοσπόριο στην ελιά, πηγή: [https://giorgoskatsadonis.blogspot.com/2018/08/blog-post\\_24.html](https://giorgoskatsadonis.blogspot.com/2018/08/blog-post_24.html)

Προσβάλλει κυρίως τους καρπούς όταν πλησιάζουν στην ωρίμανση ή τους ώριμους. Η προσβολή αρχίζει κυρίως από την κορυφή του καρπού ή το σημείο πρόσφυσής του με τον ποδίσκο. Στην αρχή εμφανίζεται μία κηλίδα καστανοϊώδους η οποία εξαπλώνεται και καταλαμβάνει το μεγαλύτερο μέρος του καρπού. Το προσβεβλημένο μέρος του καρπού βυθίζεται, ρυτιδώνεται και σε λίγες ημέρες εμφανίζονται οι καρποφορίες του μύκητα σαν μαύρα στίγματα, σε ομόκεντρους κύκλους. Η βλάστηση των σπορίων του μύκητα ευνοείται σε θερμοκρασίες 10-25°C. Οι θερμοκρασίες που αναπτύσσεται ο μύκητας είναι μεταξύ 0-29°C με ευνοϊκότερους τους 25°C. Για να μολυνθούν οι καρποί είναι απαραίτητη η ύπαρξη σταγόνας νερού ή πολύ υψηλής σχετικής υγρασίας (92-100% για 48-120 ώρες).

Αντιμετώπιση: Συνιστώνται προληπτικοί ψεκασμοί με χαλκούχα (Βορδιγάλειο πολτό κ.α.) τέλη Σεπτεμβρίου-Οκτωβρίου.

### Κερκόσπορα (μύκητας *cercospora cladosporioides*)



Εικόνα 1.10: κερκόσπορα στην ελιά, πηγή: <http://www.elies-ladikalamatiano.gr/>

Στους πράσινους καρπούς εμφανίζονται καστανές κηλίδες ελαφρά βυθισμένες διαμέτρου 4-10 mm. Κάτω από τις κηλίδες ο ιστός είναι καστανός. Στα φύλλα, στην επάνω επιφάνεια του ελάσματος εμφανίζονται κίτρινες περιοχές οι οποίες στη συνέχεια εξελίσσονται σε νεκρωτικές. Στα αρχικά στάδια εμφανίζονται στην κάτω επιφάνεια του φύλλου περιοχές γκριζωπού μεταχρωματισμού. Οι μολύνσεις αρχίζουν συνήθως το φθινόπωρο μετά τις πρώτες βροχές και συνεχίζονται το χειμώνα.

Αντιμετώπιση: Προληπτικοί ψεκασμοί με χαλκούχα. Οι ψεκασμοί κατά του κυκλοκόνιου αντιμετωπίζουν και την κερκόσπορα.

#### **Ίσκα (Fomitiporia mediterranea ή Phellinus pumetatus)**



Εικόνα 1.11: ίσκα σε ελιά, πηγή: <https://www.kalliergo.gr/>

Η συγκεκριμένη ασθένεια είναι από τις πιο σοβαρές αμπελοειδών στη χώρα μας. Τα τελευταία χρόνια έχει εξελιχθεί σε θανάσιμο κίνδυνο και για την ελιά στη Μεσσηνία. Η εκτεταμένη χρήση του αλυσοπρίονου για το κλάδεμα της ελιάς όπου δημιουργούνται μεγάλες τομές οι οποίες μένουν ακάλυπτες από ένα απολυμαντικό είναι η βασική

αιτία εκδήλωσης της ασθένειας.

Χαρακτηριστικό σύμπτωμα είναι η μαλακή σήψη του ξύλου στο κέντρο των βραχιόνων και του κορμού. Η νέκρωση αρχίζει από τις μεγάλες τομές του κλαδέματος.

Άλλες μυκητολογικές ασθένειες μικρότερου ενδιαφέροντος είναι η Βερτιτσιλλίωση κυρίως σε αρδεύομενους ελαιώνες και οι σηψιρριζίες που προκαλούνται από τους μύκητες *Armillaria melea* και *Rosellinia necatrix*.

#### **Βακτηριολογικές ασθένειες**

Καρκίνωση ή φυματίωση της ελιάς (*Pseudomonas savastanoi*) Η ασθένεια είναι διαδεδομένη σε όλες τις ελαιοκομικές περιοχές του κόσμου. Το χαρακτηριστικό σύμπτωμα είναι ο σχηματισμός εξογκωμάτων στους κλαδίσκους, μεγάλους κλάδους, στον κορμό, στις ρίζες και σπανιότερα στα φύλλα. Η μόλυνση γίνεται κυρίως μέσω των τραυμάτων που δημιουργούνται από παγετό, χαλάζι και το ράβδισμα που συνηθίζεται στη Μεσσηνία κατά τη συγκομιδή.

Αντιμετώπιση: Ψεκασμός με χαλκούχα φάρμακα αμέσως μετά τη δημιουργία τραυμάτων (χαλάζι, παγετός, ράβδισμα. ( <http://elies-ladikalamatiano.gr>)

#### **Εχθροί**

Μερικοί από τους σοβαρότερους εχθρούς της ελιάς είναι οι παρακάτω:

**Πυρηνοτρήτης (*Prays oleae* Bernard, Lepidoptera: Yponomeutidae)**, οποίος προκαλεί ζημιές στα φύλλα, στα άνθη και στους καρπούς,



Εικόνα 1.12: έντομο πυρηνοτρήτη, πηγή: <https://www.erosmykonos.gr/>



το λεκάνιο (*Saissetia oleae* Bernard, Hemiptera: Coccidae), το οποίο απομυζά φυτικούς χυμούς και εκκρίνει μελιτώματα που ευνοούν την ανάπτυξη της καπνιάς



Εικόνα 1.13: λεκάνιο στην ελιά πηγή: <https://easnmn-press.gr/>

η ψύλλα ή βαμβακάδα (*Euphyllura olivina*, Hemiptera: Psyllidae), η οποία προσβάλλει τους νεαρούς βλαστούς και τις ανθοταξίες,



Εικόνα 1.14: βαμβακάδα ελιάς, πηγή: <http://www.fytokomia.gr/>

Το ακμαίο είναι μικρό έντομο μήκους 1,5-3 mm και έχει χρώμα ανοιχτό πράσινο. Οι νύμφες είναι μικρές και έχουν χρώμα υπόλευκο. Η βαμβακάδα έχει 3 - 4 γενεές το χρόνο. Διαχειμάζει ως ακμαίο στη βάση κλαδιών και φύλλων. Την άνοιξη δραστηριοποιείται και ωτοκεί κατά προτίμηση στη βάση των ανθοταξιών. Οι νεαρές προνύμφες εγκαθίστανται στις ανθοταξίες και στα φύλλα όπου σχηματίζουν βαμβακώδεις αποικίες εκκρίνοντας άφθονη κηρώδη λευκή ουσία. Εκεί συμπληρώνουν την ανάπτυξή τους απομυζώντας χυμούς. Από την προσβολή εξασθενούν κλαδίσκοι και ανθοταξίες και τα προσβεβλημένα άνθη δεν δένουν.

ο **φλοιοτρίβης** (*Phloeotribus scarabaeoides* Bernard, Coleoptera: Scolytidae), οποίος δημιουργεί στοές στη βάση των ταξιανθιών και των καρποφόρων βλαστών, καταστρέφοντάς τους,

οι **κηκιδόμυγες** (όπως οι, *Thomasiniana oleisuga* Targ., *Dasyneura oleae* Loew, και *Prolasioptera berlesiana* Paoli, Diptera: Cecidomyiidae), οι οποίες προσβάλλουν τους καρπούς και είναι συνήθως φορείς του μύκητα *S. dalmatica*,

ο **θρίπας** (*Liothrips oleae* Costa, Thysanoptera: Phloeothripidae), οποίος προσβάλλει τους βλαστούς και τα φύλλα και πολλές φορές προκαλεί ανθόρροια, παραμόρφωση και πτώση καρπών,

ο **ρυγχίτης** (*Coenorrhinns cribripennis* Desb., Coleoptera: Curculionidae), οποίος προσβάλλει τους καρπούς. Είναι σχετικά μικρό έντομο, μήκους 5-7 mm, χρώματος κεραμίδι στη ράχη και μαύρου στην κοιλιά. Η προνύμφη έχει χρώμα λευκοκίτρινο. Έχει μία γενεά το

χρόνο. Διαχειμάζει ως ακμαίο στο έδαφος. Την άνοιξη δραστηριοποιείται και τρέφεται αρχικά με τρυφερές βλαστικές κορυφές, ενώ αργότερα (από τον Ιούνιο και μετά) από τους καρπούς, τους οποίους τρυπά με το ρύγχος του. Στα σημεία προσβολής ο καρπός παρουσιάζει ελαφρά βυθισμένες κοιλότητες και γενικά, όταν τα νύγματα είναι αρκετά, η επιφάνειά του γίνεται ανώμαλη. Όταν ο πυρήνας του καρπού έχει ήδη ξυλοποιηθεί (Ιούλιος), το θηλυκό ανοίγει με το ρύγχος μια οπή ωοτοκίας μέχρι την επιφάνεια του πυρήνα και αποθέτει από ένα αυγό σε κάθε καρπό. Από τα νύγματα διατροφής προκαλείται καρπόπτωση, η οποία μερικές χρονιές και κατά περιοχές είναι σοβαρότατη.

διάφορα άλλα είδη εντόμων, όπως τα *Zeuzera pyrina* L., (Lepidoptera: Cossidae), *Calocoris trivialis* Costa, (Hemiptera: Miridae), *Pollinia pollini* Costa (Homoptera: Asterolecaniidae), νηματώδεις, πουλιά, και ο σημαντικότερος εχθρός (για την Ελλάδα), δάκος, *Bactrocera oleae* (Diptera: Tephritidae).

## 2. ΔΑΚΟΣ ΤΗΣ ΕΛΙΑΣ, *Bactrocera* (Dacus) *oleae* (Gmelin)

### 2.1. Προέλευση και εξάπλωση

Ο δάκος της ελιάς, *Bactrocera* (Dacus) *oleae* (Gmelin), Diptera: Tephritidae, είναι το πιο επιβλαβές έντομο της ελιάς παγκοσμίως. Συναντάται στις μεσογειακές περιοχές της νότιας Ευρώπης, αλλά βρίσκεται επίσης στη Νότιο και Κεντρική Αφρική (Rice, 2000), τα Κανάρια Νησιά, τη Μέση Ανατολή, και γενικότερα σε όλες σχεδόν τις περιοχές, στις οποίες γίνεται εντατική καλλιέργεια ελαιόδεντρων καθώς και χωρών όπου τα άγρια ελαιόδεντρα είναι αυτόχθονα είδη. Εξαιρούνται περιοχές όπου ελιά έχει εισαχθεί από τον άνθρωπο, όπως Κεντρική και Βόρεια Αμερική, Νότια Αμερική (Αργεντινή, Χιλή, Περού, Ουρουγουάη), Κεντρική Ασία (Κίνα) και Αυστραλία. Πρόσφατα εντοπίστηκε για πρώτη φορά και στην πολιτεία της Καλιφόρνια, Η.Π.Α., ενώ έχει συλληφθεί σε παγίδες και στο Μεξικό (Nardi et al., 2005). Στη Σερβία υπάρχει επίσης αναφορά παρουσίας του εντόμου όπου πιθανώς αποτελεί και το βορειότερο όριο εξάπλωσης του εντόμου (Κωβαίος και συνεργάτες, 2001, και αναφορές που δίνουν). Ωστόσο, ακόμα δεν έχει εντοπιστεί στη Νότια Αμερική, Αυστραλία και Κεντρική Κίνα (Tzanakakis, 2006). Ο δάκος της ελιάς φαίνεται να έχει την ικανότητα να αποικίζει γρήγορα νέες περιοχές και γι' αυτό το λόγο κάθε χώρα που έχει ελαιοπαραγωγή θεωρείται ότι κινδυνεύει από εισβολή δάκου (Smith, 2001). Μάλιστα, οι περισσότεροι μελετητές του, συμφωνούν πως ο δάκος και το ελαιόδεντρο συνδέονται με τέτοιο τρόπο μεταξύ τους, έτσι ώστε στην πάροδο των χρόνων ακολούθησαν παράλληλες πορείες εξάπλωσης. Για τη στενή αυτή σχέση υπεύθυνες είναι οι προνύμφες του, που είναι μονοφάγες και αποκλειστική τους τροφή είναι το μεσοκάρπιο του ελαιόκαρπου. Επιπλέον, οι ερευνητές συμφωνούν μεταξύ τους πως ο δάκος μπορεί να επιβιώσει και να αναπτυχθεί σε οποιαδήποτε περιοχή του κόσμου υπάρχουν ελιές, άγριες ή ήμερες.



Εικόνα 2.1: Ο δάκος της ελιάς, πηγή: <http://www.haniotika-neo.gr/>

## 2.2. Συστηματική Κατάταξη

Ο δάκος της ελιάς, *Bactrocera* (*Dacus*) *oleae* (Gmelin), ανήκει στην οικογένεια Tephritidae της τάξης των Διπτέρων (Diptera). Η οικογένεια αυτή περιλαμβάνει τις λεγόμενες "μύγες των φρούτων" ("fruit flies"), μία ομάδα εντόμων-εχθρών της γεωργικής παραγωγής με μεγάλη οικονομική σημασία, και αποτελείται από έξι υποοικογένειες και 27 φυλές. Οι υποοικογένειες είναι: Tachiniscinae, Blepharoneurinae, Phytalmiinae, Dacinae, Trypetinae και Tephritinae (Korneyev, 1999). Η υποοικογένεια Dacinae, στην οποία ανήκει ο δάκος, αποτελείται από τις φυλές Ceratitidini, Dacini και Gastrozonini. Στα Ceratitidini ανήκει, επίσης, ο πολύ σημαντικός εχθρός *Ceratitis capitata* Wied., γνωστή μύγα της Μεσογείου. Η φυλή Dacini διακρίνεται στα γένη *Bactrocera*, *Dacus* και *Monacrostichus*. Τα δύο πρώτα διακρίνονται σε δέκα και οκτώ, αντίστοιχα, υπογένη. Μέχρι το 1989, οπότε η συστηματική των Tephritidae αναθεωρήθηκε, ο δάκος της ελιάς ανήκε στο γένος *Dacus*, το οποίο περιλαμβάνει είδη που συναντιούνται σχεδόν αποκλειστικά στην Αφρική (Δήμου, 2002). Θεωρήθηκε σωστότερο να μεταφερθεί στο γένος *Bactrocera* (που παλαιότερα συμπεριλαμβανόταν στο *Dacus*), το οποίο συγκεντρώνει είδη ιθαγενή της τροπικής Ασίας, Αυστραλίας και του Νοτίου Ειρηνικού, με κάποια να συναντιούνται επίσης στην Αφρική και σε εύκρατες περιοχές της Ευρώπης και της Ασίας. Όλα τα υπογένη του *Bactrocera* είναι τα: *Afrodacus*, *Aglaodacus*, *Apodacus*, *Asiadacus*, *Austrodacus*, *Bactrocera*, *Bulladacus*, *Daculus*, *Diplodacus* και *Gymnodacus*.

## 2.3. Μορφολογία

Το ενήλικο έντομο είναι μία μύγα με μήκος 4-5 mm και άνοιγμα φτερών 10-12 mm. Το κεφάλι έχει ανοιχτό καστανό χρώμα, και στα μάτια παρατηρούνται πρασινωπές μεταλλικές ανταύγειες. Ο θώρακας είναι σκοτεινότερος στα νώτα και έχει συνήθως 2-4 σκούρες ταινίες (γκρι ή μαύρες) κατά μήκος και υπόλευκο ή υποκίτρινο θυρεό, όπως επίσης υπόλευκες ή υποκίτρινες κηλίδες στα πλάγια. Τα φτερά είναι διαφανή, ιριδίζοντα, με ένα σκοτεινό στίγμα στην άκρη και ξεχωρίζουν από αυτλα άλλων ειδών που είναι συνήθως έγχρωμα ή φέρουν μοτίβα. Η μεσαία ταινία επιμηκύνεται λίγο προς τα πίσω. Η κοιλιά του είναι καφέ και στα θηλυκά καταλήγει σε ισχυρό ωοθέτη, εξωεκτατό και ισομήκη. Οι αλτήρες είναι λευκοί και τα πόδια κιτρινοκόκκινα (Τζανακάκης και Κατσόγιαννος, 2003). Το αυγό είναι λευκό και είναι επίμηκες, μήκους περίπου 0,7mm και διαμέτρου 0,2 mm και εισάγεται με τη βοήθεια του ωοθέτη στο μεσοκάρπιο του ελαιοκάρπου (Τζανακάκης και Κατσόγιαννος, 2003). Η προνύμφη του εντόμου έχει χρώμα είναι υπόλευκο ή ανοιχτοκίτρινο, τελικού μήκους 7-8 mm, με το πρόσθιο μέρος του σώματος στενότερο από το οπίσθιο και χωρίς κεφαλική κάψα, όπως



συμβαίνει σε προνύμφες άλλων ειδών της οικογένειας Tephritidae. Στο πρόσθιο μέρος του σώματος των προνυμφών υπάρχουν τα στοματικά γναθικά άγκιστρα, όπως σε όλα τα κυκλόραφα δίπτερα, τα οποία έχουν σκούρο χρώμα καθώς επίσης και ο υπόλοιπος κεφαλοφαρυγγικός σκελετός. Η νύμφη έχει σχήμα ελλειψοειδές, είναι ανοιχτοκάστανη και έχει ως περίβλημα το σκληρυμένο δερμάτιο της αναπτυγμένης προνύμφης, το μέγεθος της είναι περίπου 4-5mm (Τζανακάκης και Κατσόγιαννος, 2003). Για την έξοδο του ενήλικου εντόμου, σχηματίζεται χαρακτηριστική κυκλική σχισμή (κυκλόραφα) στο ένα άκρο του περιβλήματος της νύμφης (Μπρούμας και Κατσόγιαννος, 2009).



Εικόνα 2.3: προσβολή ελιάς από δάκο, πηγή: <http://geoponicblog.blogspot.com>

#### 2.4. Βιολογικός κύκλος του εντόμου

Η θερμοκρασία και η υγρασία του περιβάλλοντος επηρεάζουν σε μεγάλο βαθμό την ικανότητα αναπαραγωγής και την ανάπτυξη των πληθυσμών του δάκου. (Tzanakakis and Koneos, 1986; Koneos and Tzanakakis, 1990, 1993; Koneos, 2001; Broufas et al., 2009 και αναφορές που δίνουν). Ο δάκος της ελιάς, χαρακτηρίζεται έντομο πολυκυκλικό, δηλαδή συμπληρώνει περισσότερους από έναν βιολογικούς κύκλους μέσα στο έτος. Έτσι, σε συνθήκες ευνοϊκές για την αναπαραγωγή και την ανάπτυξή του (ύπαρξη διαθέσιμων καρπών για ωοτοκία, κατάλληλη θερμοκρασία και υγρασία κ.ά.) οι γενιές μπορούν να διαδέχονται μία την άλλη χωρίς διακοπή καθ' όλη τη διάρκεια του έτους. Σύμφωνα με τα παραπάνω, ιδιαίτερα ευνοείται σε περιοχές όπου υπάρχουν και άγριες ελιές, και οι καλλιεργούμενες περιλαμβάνουν τόσο πρώιμες όσο και όψιμες ποικιλίες. Στις παραμεσόγειες χώρες όπως η Ελλάδα, ο αριθμός των γενεών κυμαίνεται μεταξύ 2 με 5, στην χώρα μας κυρίως έχει 3 με 4 γενεές (Τζανακάκης και Κατσόγιαννος, 2003). Στην Κεντρική Ελλάδα η πρώτη γενεά εμφανίζεται με την έναρξη του καλοκαιριού (Ιούνιο – Ιούλιο) και οι επόμενες δύο εμφανίζονται το φθινόπωρο μέχρι και τον χειμώνα (Τζανακάκης και Κατσόγιαννος, 2003). Ο αριθμός των γενεών ποικίλει ανάλογα με τις περιβαλλοντικές συνθήκες που επικρατούν την κάθε χρονιά και τις διαθέσιμες ελιές για ωοτοκία. Η ωοτοκία στις νότιες περιοχές της Μεσογείου πραγματοποιείται από τον Ιούλιο και αργότερα (Tzanakakis, 2006). Τότε οι ελιές έχουν υποστεί αρκετή ωρίμανση και έχουν φτάσει στο τελικό μέγεθός τους ώστε να διευκολύνεται το ενήλικο θηλυκό να διατρυπήσει τον καρπό με τον ωοθέτη του. Στα ενήλικα θηλυκά του δάκου της ελιάς από την άνοιξη έως τα μέσα

καλοκαιριού δεν παρατηρείται ωρίμανση των ωαρίων τους δηλαδή χαρακτηριστικά μιας αναπαραγωγικής διάπαυσης (Tzanakakis and Koneos, 1986). Η ωοπαραγωγή τους επηρεάζεται από τις κλιματικές συνθήκες, τα χαρακτηριστικά των διατροφικών πηγών του θηλυκού και τη διαθεσιμότητα καρπών. Η ύπαρξη ώριμων καρπών φαίνεται να αποτελεί σημαντικό παράγοντα για την αναπαραγωγική ετοιμότητα των θηλυκών. Οι ώριμοι καρποί αποτελούν πηγή αμινοξέων, βιταμινών και άλλων αυξητικών παραγόντων που χρειάζονται για να επιτευχθεί η ωρίμανση των ωαρίων. Εικάζεται ότι ο καρπός της ελιάς συντελεί στην ωρίμανση των ωαρίων στις ωοθήκες καθώς περιέχει χημικές ουσίες που δρουν μέσω του νευρικού ή ενδοκρινικού συστήματος. Η ύπαρξη ή όχι καρπών ελιάς έδειξε να έχει θετική συσχέτιση στην ωρίμανση των ωαρίων ανεξάρτητα από άλλους παράγοντες και αυτό εξηγείται καθώς αποτελούν πηγή βιταμινών και αμινοξέων (Koneos and Tzanakakis, 1990). Συνήθως το θηλυκό εναποθέτει ένα αυγό ανά καρπό, ωστόσο σε περιπτώσεις υψηλών πληθυσμών και περιορισμένης καρποφορίας μπορεί να αναπτυχθούν δύο ή περισσότερες προνύμφες στον ίδιο καρπό. Το θηλυκό ανοίγει αρχικά μία χαρακτηριστική μικρή τριγωνική οπή στον ελαιόκαρπο και ακολούθως αποθέτει ένα αυγό. Σε ευνοϊκές συνθήκες τα θηλυκά αποθέτουν 13-40 αυγά ημερησίως (Tzanakakis, 2006), και στο σύνολο της ζωής τους 150 με 400 (Μπρούμας και Κατσόγιαννος, 2009). Μετά την απόθεση του αυγού, το θηλυκό αναρροφά χυμό από τον ελαιόκαρπο που εκρέει από την παραπάνω τριγωνική οπή και στην συνέχεια, τον αλείφει στην επιφάνεια προκειμένου να μην αποτραπούν άλλα θηλυκά να ωοτοκήσουν τον ίδιο καρπό.

Το στάδιο του αυγού ακολουθούν τρία προνυμφικά στάδια, έπειτα η νύμφη (pupa) ή βομβύκιο με μεταμόρφωση, και τέλος, με τη δεύτερη μεταμόρφωση το ενήλικο. Κατά το μεγαλύτερο μέρος της χρονιάς η ανάπτυξη των ανηλίκων ολοκληρώνεται μέσα στον καρπό της ελιάς. Στα τέλη του φθινοπώρου όμως η προνύμφη 3ου σταδίου δεν μεταμορφώνεται στον καρπό αλλά τον εγκαταλείπει ("migrating larvae") και μεταμορφώνεται στο έδαφος, συνήθως στα πρώτα δέκα εκατοστά ή σε σχισμές του φλοιού του ελαιόδεντρου. Αιτία αυτού ίσως να είναι η αποφυγή δυσμενών περιβαλλοντικών συνθηκών. Έτσι, καθώς παραμένουν στον καρπό κατά τους θερινούς μήνες, οι προνύμφες αποφεύγουν τις υψηλές θερμοκρασίες που αναπτύσσονται στην επιφάνεια του εδάφους. Από τον Οκτώβριο, όπως μετακινούνται στο έδαφος, προστατεύονται από τα πουλιά που τρώνε τους ώριμους, πλέον, καρπούς (Karpatos & Fletcher 1984). Επιπλέον πιστεύεται πως αλλαγή του υποστρώματος της νύμφωσης είναι μία εξελικτική προσαρμογή έναντι στη συγκομιδή του καρπού της ελιάς, που πραγματοποιείται προς τα τέλη του Φθινοπώρου. Προς το παρόν το έναυσμα για τη μετακίνηση δεν έχει ακόμα ξεκαθαριστεί, φαίνεται όμως ότι είναι ένας συνδυασμός αλλαγών στη φωτοπερίοδο και τη χημική σύσταση του καρπού.

Ο βιολογικός κύκλος του δάκου επηρεάζεται από τις περιβαλλοντικές συνθήκες αφού είναι αυτές που επηρεάζουν και την ωρίμανση και σύσταση του ελαιόκαρπου. Η αυξημένη υγρασία στο περιβάλλον ενισχύει την αύξηση του μεγέθους των καρπών καθώς και την εκροή μελιτωμάτων από τα δέντρα που αποτελούν πηγή ενέργειας για το έντομο. Η θερμοκρασία του περιβάλλοντος επηρεάζει άμεσα όλα τα στάδια του βιολογικού κύκλου. Σε σταθερές θερμοκρασίες, εργαστηριακές μελέτες έδειξαν ότι σε θερμοκρασία των 35°C ο δάκος της ελιάς παρουσιάζει την μεγαλύτερη ταχύτητα ανάπτυξης για την ολοκλήρωση των σταδίων του αυγού και της προνύμφης αλλά επιφέρει θνησιμότητα στο στάδιο της νύμφης. Το κατώτατο όριο ουδός ανάπτυξης για τα ανήλικα στάδια του δάκου της ελιάς για το αυγό, την προνύμφη και την νύμφη είναι 9.19°C, 13.94°C και 12.36°C, αντίστοιχα. Η βέλτιστη θερμοκρασία για

την ανάπτυξη και επιβίωση των ανήλικων σταδίων είναι η 27°C. (Genç and Nation, 2008). Ο χειμώνας όπου δεν υπάρχουν αρκετοί διαθέσιμοι, όπου η θερμοκρασία είναι χαμηλή και ενδεχομένως να συνυπάρχουν και αντίξοες περιβαλλοντικές συνθήκες (π.χ. ισχυροί άνεμοι), αποτελούν τους κυριότερους περιοριστικούς παράγοντες του εντόμου. Ο πληθυσμός του εντόμου αυτή την περίοδο αποτελείται κυρίως από βομβύκια στο έδαφος και λιγότερο από ανήλικα στον καρπό και ενήλικα που μπορεί να επιβιώσουν ως την ερχόμενη άνοιξη αν οι συνθήκες δεν είναι τόσο δύσκολες. Οι χαμηλές θερμοκρασίες, η δράση διαφόρων θηρευτών και η υψηλή υγρασία στο έδαφος οδηγεί σε υψηλή θνησιμότητα (50-90%) των βομβυκίων (Bigler 1982, Kapatos & Fletcher 1986). Το καλοκαίρι, ο σημαντικότερος περιοριστικός παράγοντας του πληθυσμού του εντόμου είναι οι υψηλές θερμοκρασίες, ιδιαίτερα όταν συνδυάζονται με χαμηλή σχετική υγρασία (Orfanidis & Karayannis 1958, Martelli 1963, Delrio 1978, Pucci et al. 1982, Kapatos & Fletcher 1984, Kapatos & Fletcher 1986). Οι παραπάνω συνθήκες όμως, επιδρούν και έμμεσα στους πληθυσμούς του εντόμου, καθώς οδηγούν σε συρρίκνωση και αφυδάτωση του καρπού της ελιάς και έτσι καθίσταται αδύνατη η για να συντηρήσει των ανήλικων σταδίων. Η αυξημένη ατμοσφαιρική υγρασία γενικά ευνοεί το έντομο άμεσα και έμμεσα. Άμεσα γιατί μπορεί να μειώσει τις επιπτώσεις μιας θερμικής καταπόνησης κατά τη θερμή περίοδο και έμμεσα, γιατί συμβάλλει στο να αυξηθούν οι καρποί σε μέγεθος και να καταστούν περισσότερο ευπρόσβλητοι, αλλά και γιατί προκαλεί την εκροή μελιτώματος από τα ελαιόδεντρα και άλλα φυτά, από το οποίο διατρέφονται τα ενήλικα έντομα.

Από τα τέλη καλοκαιριού ως τον Οκτώβριο οι προνύμφες του δάκου προσβάλλονται σε ένα αυξημένο ποσοστό από ορισμένα παρασιτοειδή Υμενόπτερα. Παρ' όλο που έχει αναφερθεί και παρασιτισμός της τάξης του 80% (Delrio 1978), θνησιμότητα που προκαλείται από αυτά είναι γενικά περιορισμένη. Στην Κέρκυρα, κατά το 1976-77 και 1977-78 το μέσο ποσοστό παρασιτισμού των προνυμφών ήταν 11,1% (Kapatos & Fletcher 1986). Τα ποσοστά αυτά δεν είναι δυνατόν να προκαλέσουν μακροπρόθεσμες μειώσεις στους πληθυσμούς του δάκου (Pappas et al 1977). Επιπλέον, παρά τη διατήρηση του πληθυσμού του δάκου σε υψηλά επίπεδα, οι πληθυσμοί των παρασιτοειδών από τα μέσα του Οκτωβρίου και έπειτα παρουσιάζουν συνήθως ελάττωση. Αυτό οφείλεται στην ύπαρξη εναλλακτικών ξενιστών και στη σταδιακή ελάττωση της δραστηριότητάς τους λόγω της πτώσης της θερμοκρασίας (Kapatos & Fletcher 1986).

Έτσι λοιπόν, προκύπτει ότι ο ετήσιος βιολογικός κύκλος του δάκου της ελιάς διαφέρει όπου διαφέρουν και οι συνθήκες από τις οποίες εξαρτάται. Για παράδειγμα, σε ότι αφορά στην εμφάνιση του εντόμου σε μία μεγάλη κλίμακα, στις βόρειες περιοχές της λεκάνης της Μεσογείου (Γαλλία, Γιουγκοσλαβία κ.ά.) η εξέλιξη των πληθυσμών του δάκου διακόπτεται κυρίως από τις αντίξοες συνθήκες του χειμώνα. Στις νότιες περιοχές (π.χ. Β. Αφρική, Λίβανος, Συρία) διακόπτεται από το θερμό και ξηρό καλοκαίρι, ενώ στις ενδιάμεσες (Ιταλία, Ελλάδα) επηρεάζεται και από τις δύο περιόδους (Katsoyianos 1992). Όμως και εντός της χώρας μας, από περιοχή σε περιοχή διαφέρει και η εμφάνιση του πληθυσμού του δάκου αλλά και ο αριθμός των γενιών που μπορούν να αναπτυχθούν.

## 2.5. Ξενιστές του εντόμου



Αναφορές υποστηρίζουν πως ο δάκος είναι μονοφάγο έντομο και προσβάλλει τους καρπούς των τριών ειδών του γένους *Olea*: *Olea europaea* var. *sativa*, *Olea europaea* var. *cuspidata*, *Olea europaea* var. *chrysophilla*. (Tzanakakis, 2006). Ο δάκος φαίνεται να προτιμά περισσότερο τις μεγαλόκαρπες ποικιλίες με μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε νερό σε σχέση με τις ελαιοποιήσιμες και μικρόκαρπες. Αυτό πιθανότατα να οφείλεται στο ότι οι μεγαλόκαρπες δίνουν μεγαλύτερο αριθμό προνυμφών με μεγαλύτερη επιβίωση. Επίσης, οι μεγαλύτεροι σε μέγεθος καρποί έχουν πιο μαλακό φλοιό οπότε είναι πιο εύκολο για τον δάκο να τους προσβάλλει. Στην Ελλάδα μία ποικιλία που είναι λιγότερο ευαίσθητη στον δάκο είναι η Κορωνέικη σε σχέση με την μεγαλόκαρπη ποικιλία επιτραπέζιων ελιών Τσουνάτη (Rice, 2000).

Τα ενήλικα άτομα του δάκου τρέφονται με νέκταρ φυτών, γύρη, και άλλες υγρές τροφές που εκκρίνονται από τραύματα καρπών, φύλλων και βλαστών (Mohammad, 2005). Τις ουσίες αυτές τα έντομα τις παίρνουν από τα ελαιόδεντρα αλλά και από άλλα φυτά τα οποία βρίσκονται δίπλα ή μακριά από τους ελαιώνες (Tzanakakis, 2006). Ο δάκος εκτός από τις καλλιεργήσιμες επιτίθεται και σε άγριες ελιές. Η προσβολή σε άγριες ελιές έχει ως αποτέλεσμα την εξάπλωση του δάκου από την ανατολική Μεσόγειο μέχρι την κεντρική και νότια Αφρική όπου συνυπάρχουν άγριες με καλλιεργήσιμες ελιές.

## 2.6. Ζημιές και οικονομική σημασία

Τα ενήλικα και οι προνύμφες του δάκου προκαλούν τεράστιες ζημιές στον ελαιόκαρπο που ποικίλλουν από έτος σε έτος. Το θηλυκό ενήλικο εναποθέτει τα αυγά του στην επιφάνεια του καρπού και από αυτά προκύπτουν οι προνύμφες. Ένας μέσου μεγέθους καρπός εκτιμάται ότι θα χάσει περίπου το 1/5 έως το 1/4 του μεσοκαρπίου του προκειμένου να αναπτυχθεί μία προνύμφη. Αν ο καρπός έχει προσβληθεί από περισσότερες της μίας προνύμφες προφανώς θα χάσει περισσότερο βάρος για την ανάπτυξή τους. Η καταστροφή του ελαιόκαρπου από δάκο οδηγεί σε πρόωρη πτώση των φρούτων. Το σαρκώδες τμήμα του καρπού καταστρέφεται και διευκολύνεται η μόλυνση του καρπού με την είσοδο μυκήτων και βακτηρίων. Οι οργανισμοί αυτοί καταστρέφουν τον καρπό και επιπλέον αυξάνουν την οξύτητα του παραγόμενου λαδιού, λόγω δράσης λιπολυτικών ενζύμων ελαττώνοντας έτσι την ποιότητά του. Επίσης, λόγω των οπών που προκαλεί ο δάκος στον ελαιόκαρπο, η έκθεση στον ατμοσφαιρικό αέρα ευνοεί η οξείδωση του ελαιόλαδου. Τέλος, η εναπόθεση αυγών από το θηλυκό καθιστά την επιτραπέζια ελιά μη εμπορεύσιμη. (Paul Vossen, 2004). Η αποδεκτή οικονομική ζημία που προκαλείται στην παραγωγή επιτραπέζιας ελιάς θα πρέπει να κυμαίνεται σε επίπεδα κάτω από 1 %, ενώ στον τομέα της παραγωγής λαδιού στο 5-10% ( Paul Vossen, 2004). Σε ανεξέλεγκτες προσβολές από δάκο οι οικονομικές ζημιές στην παραγωγή επιτραπέζιας ελιάς υπολογίζονται ακόμα και σε ποσοστό 100%. Οι οικονομικές απώλειες όσον αφορά στο λάδι αγγίζουν ποσοστά 80-100%, συμπεριλαμβάνοντας αυτά που αναφέρθηκαν παραπάνω, όπως πτώση των καρπών, καταστροφή του σαρκώδους τμήματος του καρπού και αύξηση της οξύτητας του λαδιού (Rice, 2000).

## 2.7. Καταπολέμηση του δάκου της ελιάς

Η τεράστια οικονομική σημασία της παραγωγής ελαιόλαδου και επιτραπέζιας ελιάς στις Μεσογειακές χώρες κάνει απαραίτητη τη λήψη μέτρων προκειμένου να καταπολεμηθεί ο δάκος και να περιοριστούν στο ελάχιστο οι ζημιές που προκαλεί. Η κυριότερη μέθοδος που χρησιμοποιείται παραπάνω από 20 χρόνια βασίζεται σε χρήση εντομοκτόνων, συγκεκριμένα οργανοφωσφορικών.

#### *2.7.1. Δολωματική μέθοδος*

Προληπτική μέθοδος καταπολέμησης του δάκου με σκοπό την προσέλκυση των εντόμων και να τη θανάτωση αυτών πριν εναποθέσουν τα αυγά τους στους καρπούς της ελιάς. Βάσει αυτής της μεθόδου πραγματοποιούνται ψεκασμοί όπου χρησιμοποιούνται εντομοκτόνα, μαζί με ελκυστικό διάλυμα μίας υδρολυμένης πρωτεΐνης (Τζανακάκης και Κατσόγιαννος, 2003). Οι ψεκασμοί αυτοί γίνονται με ψεκαστήρες πλάτης και γεωργικά μηχανήματα με αντλίες πίεσεως και τα εντομοκτόνα που χρησιμοποιούνται είναι κυρίως οργανοφωσφορικά και πυρεθροειδή. Σε κάθε δένδρο ή κάθε δεύτερο ή κάθε τρίτο ανάλογα με την πυκνότητα των ελαιοδένδρων ψεκάζονται 300-500 κ.ε. ψεκαστικού υγρού ανά δένδρο στο εσωτερικό της κόμης σε μορφή χονδρών σταγονιδίων. Για να είναι αποτελεσματική μία τέτοια μέθοδος θα πρέπει να πραγματοποιείται σε μεγάλες εκτάσεις φυσικά υπό την κρατική εποπτεία (Ζιώγας, 1996). Ο χρόνος έναρξης των ψεκασμών εξαρτάται από: την πυκνότητα του πληθυσμού, την αναλογία θηλυκών αρσενικών, την παρουσία ώριμων ωαρίων στα θηλυκά (να είναι άνω του 5%) και ευνοϊκές για ωοτοκία καιρικές συνθήκες (Τζανακάκης και Κατσόγιαννος, 2003). Συνήθως οι ψεκασμοί πραγματοποιούνται 1-2 το καλοκαίρι και 2-3 το φθινόπωρο.

#### *2.7.2. Ψεκασμοί κάλυψης*

Θεραπευτική μέθοδος καταπολέμησης του δάκου που στοχεύει τόσο στην θανάτωση τόσο των ακμαίων εντόμων που κυκλοφορούν μέσα στον ελαιώνα όσο και των διαφόρων σταδίων προνύμφης που βρίσκονται μέσα στον ελαιόκαρπο. Βάσει αυτής της μεθόδου, το δέντρο ψεκάζεται ολόκληρο με υδατικά διαλύματα εγκεκριμένων για την καλλιέργεια εντομοκτόνων όταν δεν ελέγχεται ο πληθυσμός του δάκου με δολωματικό ψεκασμό και όταν η παραγωγή ελαιοποιήσιμων ποικιλιών έχει προσβληθεί σε ποσοστό πάνω από 5% και αντίστοιχα των βρώσιμων πάνω από 2% (Ζιώγας Ν.Β, 1996). Η μέθοδος αυτή είναι αποτελεσματική ακόμα και αν εφαρμόζεται σε μεμονωμένα δέντρα. Εδώ χρησιμοποιούνται κυρίως οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα (Dimethoate) και σε μικρότερο βαθμό χρησιμοποιούνται τα πυρεθροειδή και το spinosad (Skouras et al., 2007)



Εικόνα 2.4: ψεκάσμος κατά του δάκου της ελιάς, πηγή: <https://www.zarpanews.gr>

Ο δολωματικός και ο ψεκάσμος κάλυψης ανήκουν στους τρόπους της χημικής καταπολέμησης του δάκου της ελιάς. Εκτός από την χημική καταπολέμηση υπάρχουν και οι εξής τρόποι καταπολέμησης του δάκου:

Βιοτεχνολογικές μέθοδοι, που περιλαμβάνουν ενδεικτικά την μαζική παγίδευση του δάκου, εξαπόλυση στειρωμένων εντόμων ή την παρεμπόδιση σύζευξης

Βιολογική καταπολέμηση, που περιλαμβάνει τη χρήση παρασίτων και αρπακτικών εντόμων ακόμα και παθογόνων μικροοργανισμών (Ζιώγας, 1996), για τον έλεγχο του πληθυσμού του δάκου της ελιάς.

### 3. ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ

#### 3.1. Ορισμός και ταξινόμηση

Σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή Οδηγία 91/414/ΕΟΚ καθώς και την αναθεωρημένη οδηγία 1107/2009 που ισχύει σήμερα, ως «Φυτοπροστατευτικά Προϊόντα» (Plant Protection Products, PPP) ορίζονται οι δραστικές ουσίες και τα σκευάσματα τα οποία περιέχουν μία ή περισσότερες δραστικές ουσίες και προορίζονται για :

- Προστασία των φυτών ή των φυτικών προϊόντων από κάθε είδους επιβλαβείς οργανισμούς, να προλαμβάνουν την δράση τους
- Παρέμβαση στις βιολογικές διεργασίες των φυτών, (εκτός αν πρόκειται για θρεπτικές ουσίες)
- Διατήρηση των φυτικών προϊόντων (εκτός και αν πρόκειται για ουσίες ή προϊόντα που υπόκεινται σε ειδικές διατάξεις σχετικά με τα συντηρητικά)
- Καταστροφή των ανεπιθύμητων φυτών
- Καταστροφή μερών των φυτών, να επιβραδύνουν ή να παρεμποδίζουν την ανεπιθύμητη ανάπτυξή τους

Σύμφωνα με την εθνική νομοθεσία κάθε ουσία ή μίγμα ουσιών που χρησιμοποιείται για την καταπολέμηση των ασθενειών και των εχθρών των φυτών ή βελτιώνει την αποτελεσματικότητα των παραπάνω ουσιών με στόχο την ανάπτυξη της καλλιέργειας χαρακτηρίζεται σαν «Γεωργικό Φάρμακο» ή «Φυτοφάρμακο» (Γεωργική Φαρμακολογία, 2007). Στη γεωργική πρακτική σαν φυτοφάρμακα ορίζονται κυρίως τα παρασιτοκτόνα

Στην αγορά οι φυτοπροστατευτικές ουσίες διατίθενται με τη μορφή σκευασμάτων έτοιμων για χρήση ή μετά από διάλυση συνήθως σε νερό. Είναι μίγματα δύο ή περισσότερων ουσιών, όπου η μία τουλάχιστον αποτελεί τη δραστική ουσία, η υπεύθυνη ουσία για την καταπολέμηση των εντόμων ή των ζιζανίων ή την φυτοπαθογόνων μυκήτων και οι υπόλοιπες είναι οι βοηθητικές ουσίες, τα έκδοχα του σκευάσματος, που προστίθενται είτε ως διαλύτες, είτε ως παράγοντες σταθερότητας, είτε ως προσκολλητικά ή διαβρεκτικά για την αποτελεσματικότητα της εφαρμογής. Η αναλογία των χημικών ουσιών και της δραστικής ουσίας που περιλαμβάνονται σε ένα φυτοπροστατευτικό προϊόν ονομάζεται φόρμουλα (formula). (Μενκίσογλου, 1998, Μουρκίδου 1991, European Commission, 2009).

Στα φυτοπροστατευτικά προϊόντα περιλαμβάνονται τα παρακάτω:

**Παρασιτοκτόνα:** Ουσίες ή μίγματα που επιδρούν σε συγκεκριμένα βιολογικά υποστρώματα (φυτικά ή ζωικά) και στην βιολογική τους συμπεριφορά και τα οποία ευρίσκονται στη φύση ή συντίθενται τεχνητά. Δρουν θανατώνοντας ή παρεμποδίζοντας την ανάπτυξη ή την αναπαραγωγή του επιβλαβούς για το φυτό οργανισμού. Διακρίνονται σε ζιζανιοκτόνα για την εξόντωση των ζιζανίων, εντομοκτόνα για την εξόντωση των εντόμων, μυκητοκτόνα κατά των μυκήτων, νηματοδοκτόνα που εξοντώνουν τα νηματώδη σκουλήκια, ακαρεοκτόνα κατά των ακάρεων, βακτηριοκτόνα που καταπολεμούν τα βακτήρια, ή τρωκτικοκτόνα για τον έλεγχο των τρωκτικών. Τα παρασιτοκτόνα κατέχουν κυρίαρχη θέση ανάμεσα σε όλα τα φυτοπροστατευτικά προϊόντα. Ανάλογα με τη χημική τους δομή τα παρασιτοκτόνα διακρίνονται σε: οργανοφωσφορικά, οργανοχλωριωμένα, πυρεθρίνες, καρβαμιδικά, νεονικοτινοειδή κ.ά.

**Εντομοελκυστικά:** Είναι ουσίες που χρησιμοποιούνται για την προσέλκυση εντόμων και την παγίδευσή τους σε διάφορα συστήματα θανάτωσής τους. Οι ουσίες αυτές μπορεί να είναι ελκυστικά τροφής, οσμής, χρώματος ή φύλου.

**Εντομοαπωθητικά:** Είναι ουσίες που έχουν την ιδιότητα να απωθούν τα έντομα.

**Ρυθμιστές Ανάπτυξης Εντόμων:** Είναι ουσίες που επηρεάζουν τους βιοχημικούς μηχανισμούς ανάπτυξης των εντόμων και συνήθως αναφέρονται σαν μια ειδική κατηγορία εντομοκτόνων.

**Φυτορρυθμιστικές ουσίες:** Είναι οργανικές ενώσεις, φυσικές ή συνθετικές που σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις προάγουν, παρεμποδίζουν ή τροποποιούν ποιοτικά την αύξηση και την ανάπτυξη των φυτών.

**Μικροβιολογικά σκευάσματα:** Περιέχουν σε λανθάνουσα κατάσταση μικροοργανισμούς οι οποίοι μετά από κατάλληλους χειρισμούς μπορούν να δράσουν εναντίον άλλων, επιβλαβών για τις καλλιέργειες οργανισμών.

Στην αγορά, ανάλογα με την εμπορική τους μορφή που κυκλοφορούν τα φυτοπροστατευτικά προϊόντα, διακρίνονται σε στερεά, υγρά και αέρια.

### 3.2. Ιδιότητες Παρασιτοκτόνων

Τα παρασιτοκτόνα, χαρακτηρίζονται από μια σειρά φυσικοχημικών ιδιοτήτων (σημείο ζέσεως, ισομέρεια, πολικότητα, διαλυτότητα κ.λ.π.) οι οποίες επηρεάζουν σε μεγάλο βαθμό τον τρόπο με τον οποίο αυτά ασκούν τη δράση τους. Εκείνες που έχουν ιδιαίτερη σημασία για τη φυτοπροστασία είναι οι βιολογικές τους ιδιότητες που εκφράζουν την αλληλεπίδρασή τους με τα διάφορα βιολογικά υποστρώματα.

**Μηχανισμός δράσης**

Ο μηχανισμός δράσης ενός παρασιτοκτόνου αναφέρεται τόσο στον τρόπο που δρα σε κυτταρικό επίπεδο όσο και στο εύρος δράσης του, δηλαδή τον αριθμό και τα είδη των παρασίτων στα οποία μπορεί να εκδηλώσει την τοξική του δράση (Γεωργικά Φάρμακα, 2008).

Τα παρασιτοκτόνα δρουν συνήθως παρεμποδίζοντας

- βιοχημικά συστήματα παραγωγής ενέργειας (εντομοκτόνα, μυκητοκτόνα, ζιζανιοκτόνα)
- διάφορες βιοσυνθέσεις (εντομοκτόνα, μυκητοκτόνα, ζιζανιοκτόνα)
- τη λειτουργία της φωτοσύνθεσης (ζιζανιοκτόνα)
- τη λειτουργία του νευρικού συστήματος (εντομοκτόνα)
- τη δράση των φυτορμονών (ζιζανιοκτόνα)
- την κυτταρική διαίρεση (ζιζανιοκτόνα, μυκητοκτόνα)

- τη λειτουργία των κυτταρικών μεμβρανών (μυκητοκτόνα, ζιζανιοκτόνα)

Υπάρχουν περιπτώσεις όπου τα παρασιτοκτόνα εμφανίζουν περίπλοκους μηχανισμούς τοξικής δράσης που δεν έχουν διερευνηθεί πλήρως. Η ποικιλία των μηχανισμών δράσης των παρασιτοκτόνων αντιστοιχεί και στην ομαδοποίηση αυτών ανάλογα με τον τρόπο δράσης τους. Η ικανότητα ενός παρασιτοκτόνου να επιφέρει άμεσο αποτέλεσμα μέσα σε σύντομο χρονικό διάστημα από την εφαρμογή του χαρακτηρίζεται σαν **άμεση ενέργεια**. Αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό στο ενδεχόμενο ξαφνικής εμφάνισης μεγάλων πληθυσμών ενός παρασίτου σε μια καλλιέργεια και συνδέεται άμεσα με το μηχανισμό δράσης του παρασιτοκτόνου. Η δράση ορισμένων παρασιτοκτόνων επί των διαφόρων παρασίτων δεν επιφέρει πάντα θανατηφόρο αποτέλεσμα. Ανάλογα με το μηχανισμό δράσης τους και το είδος του παρασίτου μπορεί να προκαλούν παρεμπόδιση της ανάπτυξης ή της αναπαραγωγής ή της εγκατάστασης του παρασίτου στον ξενιστή και για τον λόγο αυτό χαρακτηρίζονται ως μυκητοστατικά, βακτηριοστατικά κ.τ.λ.

Παρασιτοκτόνα που δρουν επί μεγάλου αριθμού φυτοπαρασίτων χαρακτηρίζονται από **ευρύ φάσμα** δράσης. Η εφαρμογή όμως για παράδειγμα εντονοκτόνων ευρέως φάσματος, μπορεί να γίνει επικίνδυνη για τα ωφέλιμα έντομα, εκτός από την δράση τους στα βλαβερά για την καλλιέργεια έντομα.

#### *Εκλεκτική δράση*

Άλλα παρασιτοκτόνα δρουν επί ενός ή λίγων ειδών παρασίτων επιδεικνύοντας **εκλεκτική δράση**. Το συγκεκριμένο χαρακτηριστικό επιδιώκεται στη γεωργία, διότι έτσι μειώνονται οι πιθανότητες φυτοτοξικότητας και αρνητικών επιδράσεων στον ξενιστή, στον άνθρωπο και την οικολογική ισορροπία.

#### *Ενδοθεραπευτική δράση*

Ενδοθεραπευτική δράση είναι η ικανότητα του φυτοφαρμάκου να εισχωρεί και να εκδηλώνει την δράση του στο εσωτερικό των φυτικών ιστών. Το παρασιτοκτόνο σε υποκυτταρικό επίπεδο θα πρέπει να έχει εκλεκτική τοξικότητα ώστε να μην είναι φυτοτοξικό και να μην διασπάται γρήγορα, έτσι ώστε να μπορεί να κινηθεί σε σημαντική απόσταση από το σημείο εισόδου του. Η ενδοθεραπευτική δράση μπορεί να είναι: α) Διεισδυτική δράση, δηλαδή το φυτοφάρμακο να διεισδύει σε ιστούς που βρίσκονται κάτω από τη φυτική επιφάνεια και να δρα κατά των παρασίτων σε εκείνο το σημείο. β) Διασυστηματική δράση, δηλαδή το φυτοφάρμακο να εισχωρεί στους φυτικούς ιστούς, αλλά και να επιτυγχάνεται κίνηση διαμέσου των χυμών σε άλλα σημεία.

#### *Υπολειμματική δράση*

Με τον όρο υπολειμματική δράση εννοούμε τη χρονική διάρκεια μετά την εφαρμογή που ένα φυτοπροστατευτικό προϊόν παραμένει δραστικό στο έδαφος. Το χρονικό αυτό διάστημα εξαρτάται από το είδος του σκευάσματος, την αρχική δόση και τον τρόπο εφαρμογής του, από το πλοσο εύκολα ή δύσκολα αποικοδομείται και από τις επικρατούσες εδαφοκλιματικές συνθήκες (θερμοκρασία, υγρασία, μικροβιακό φορτίο του εδάφους κλπ.), παράγοντες που καθορίζουν και επηρεάζουν της σταθερότητά του. (Δημόπουλος, 1998). Με τον όρο **σταθερότητα** ενός παρασιτοκτόνου ορίζεται η ικανότητα να αποδομείται αργά ή γρήγορα και να χάνει τη βιοδραστικότητά του. Εκφράζεται με τον χρόνο ημιζωής, δηλαδή το χρονικό διάστημα μετά την εφαρμογή του, κατά το οποίο η δράση του μειώνεται κατά 50%.

(Δημόπουλος, 1998, Frehse H.,1990). Η απομάκρυνσή του από το έδαφος επιτυγχάνεται ή μέσω της φυσικής οδού (εξάτμιση, απορρόφηση από τις ρίζες, προσρόφηση, έκπλυση στα βαθύτερα στρώματα), ή μέσω της μικροβιακής, χημικής και φωτοχημικής διάσπασης.

Αν ένα παρασιτοκτόνο έχει μεγάλη υπολειμματική δράση τότε αυξάνεται η αποτελεσματικότητά του, μειώνονται οι αριθμοί των επεμβάσεων για την καταπολέμηση ενός παρασίτου καθώς επίσης και η εφαρμογή των προληπτικών εφαρμογών, πριν δηλαδή εμφανιστεί η ασθένεια ή η προσβολή. Όμως υπάρχουν περιπτώσεις, όπου η μεγάλη υπολειμματική δράση ενός παρασιτοκτόνου μπορεί να το καταστήσει επικίνδυνο για τη δημόσια υγεία και το περιβάλλον. Παρασιτοκτόνα με μεγάλο χρόνο ημιζωής είναι αυτά που δεν αποδομούνται στο περιβάλλον και συνήθως όταν εισέρχονται στις τροφικές αλυσίδες υφίσταται βιομεγέθυνση, δηλαδή η συγκέντρωσή τους αυξάνει καθώς προχωράμε προς τους τελευταίους κρίκους των τροφικών αλυσίδων. (Δημόπουλος, 1998)

#### *Συνδυαστικότητα*

Η παραπάνω ιδιότητα αφορά την ικανότητα ενός παρασιτοκτόνου να μπορεί να εκδηλώσει τη βιολογική του δράση εφαρμοζόμενο ταυτόχρονα με ένα ή περισσότερα άλλα παρασιτοκτόνα. Η δυνατότητα ανάμιξης αλλά και η ταυτόχρονη εφαρμογή δύο ή περισσότερων σκευασμάτων δεν είναι πάντα δυνατή εξαιτίας πιθανής αλληλεπίδρασης των συστατικών τους και εξαρτάται από τη μορφή των σκευασμάτων και τις φυσικοχημικές ιδιότητες των δραστικών ουσιών. Αυτό που επιδιώκεται είναι η παρασιτοκτόνος δράση του μίγματος να είναι μεγαλύτερη από το άθροισμα των επιμέρους δράσεων των παρασιτοκτόνων. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την ταυτόχρονη καταπολέμηση πολλών παρασίτων, αλλά και το οικονομικό όφελος του παραγωγού, αφού μειώνονται ο αριθμός των επεμβάσεων οπότε και το κόστος της εφαρμογής.

#### *Τοξικότητα*

Τα περισσότερα φυτοπροστατευτικά προϊόντα παρουσιάζουν υψηλή βιολογική δραστηριότητα έναντι πολλών οργανισμών μη στόχων, όπως ζώων και του ανθρώπου. Τα φυτοπροστατευτικά εισάγονται στον ανθρώπινο οργανισμό μέσω του δέρματος, του αναπνευστικού συστήματος και από το στόμα (με την τροφή).

Η τοξική ενέργεια των φυτοπροστατευτικών προϊόντων μπορεί να εκδηλωθεί μετά από μία, λίγες ή επανειλημμένη έκθεση ενός ανθρώπου και χαρακτηρίζεται σαν οξεία, υποξεία και χρόνια τοξικότητα, αντίστοιχα. Η οξεία και υποξεία τοξικότητα χαρακτηρίζεται από σαφή εκδήλωση τοξικολογικών συμπτωμάτων ή θανάτου σε σύντομο χρονικό διάστημα. Η χρόνια τοξικότητα εκδηλώνεται με βλάβες ή αλλοιώσεις οργάνων του οργανισμού και δεν οδηγεί άμεσα στο θάνατο. (Δημόπουλος, 1998)

Η τοξική δράση μπορεί να εκδηλωθεί ως:

- Αντιδράσεις υπερευαισθησίας (αλλεργίες)
- Μείωση της αντίστασης του οργανισμού
- Διαταραχή του μεταβολισμού των ξένων ουσιών στο οργανισμό
- Δυσλειτουργία ζωτικών οργάνων
- Μεταλλαξογένεση, καρκινογένεση ή τερατογένεση (Δημόπουλος, 1998)

Η τοξικότητα των διαφόρων παρασιτοκτόνων προσδιορίζεται μέσω πειραμάτων σε πειραματόζωα και αφορούν κυρίως την από το στόμα χορήγηση της τοξικής ουσίας και σπανιότερα μέσω του δέρματος και της αναπνευστικής οδού. Η οξεία τοξικότητα ενός

παρασιτοκτόνου εκφράζεται με το δείκτη LD50 (Lethal Dose, θανατηφόρος Δόση) σε mg δραστικής ουσίας ανά kg βάρους του πειραματόζωου και δηλώνει την κατώτερη δόση που απαιτείται για να προκληθεί θάνατος στο 50% των πειραματόζωων που εφαρμόστηκε (Γεωργική Φαρμακολογία, 2007).

Βάσει της ισχύουσας Ελληνικής και Ευρωπαϊκής νομοθεσίας, οι δραστικές ουσίες των γεωργικών παρασιτοκτόνων κατατάσσονται από την άποψη της οξείας τοξικότητας σε τρεις κατηγορίες :

- Δηλητήρια (κατηγορία I)
- Τοξικά (κατηγορία II)
- Επιβλαβή (κατηγορία III)

Εκτός από τον άνθρωπο και τα ανώτερα θηλαστικά, τα παρασιτοκτόνα είναι τοξικά και σε άλλες κατηγορίες οργανισμών όπως οι μέλισσες, τα ψάρια και τα πτηνά.

### 3.3. Εντομοκτόνα

Τα εντομοκτόνα μπορούν να χωριστούν σε δύο κατηγορίες, αναλόγως του τρόπου εισόδου τους στον οργανισμό των εντόμων και αναλόγως της χημικής τους σύνθεσης ή προέλευσης.

Ανάλογα με τον τρόπο εισόδου τους, τα εντομοκτόνα χωρίζονται σε:

- επαφής: εισέρχονται στον οργανισμό του εντόμου συνήθως μέσω του χιτίνινου εξωσκελετού και αρκετές φορές διαμέσου των αναπνευστικών τρημάτων. Ασκούν τη δράση τους κυρίως στο νευρικό σύστημα των εντόμων, προκαλώντας έντονες διαταραχές, παράλυση και εν τέλει θάνατο
- στομάχου: όπου εισέρχονται στον οργανισμό των εντόμων διαμέσου της στοματικής οδού και προσβάλλουν το στομάχι αλλά και ολοκληρο τον πεπτικό σωλήνα
- ασφυκτικά ή καπνογόνου δράσης: τα συγκεκριμένα εισέρχονται στον οργανισμό του εντόμου διαμέσου του αναπνευστικού συστήματος και προκαλούν θάνατο από ασφυξία. Τα εντομοκτόνα αυτά χρησιμοποιούνται κυρίως στα αποθηκευμένα γεωργικά προϊόντα, που προσβάλλονται από τα βλαβερά έντομα.

Βάσει της χημικής τους σύνθεσης τα εντομοκτόνα διακρίνονται σε:

A) Ανόργανα: Τα ανόργανα είναι μεταλλικές (αρσενικού, χαλκού, ψευδαργύρου, υδραργύρου) ή μη μεταλλικές ενώσεις (θείου, νατρίου, φθορίου). Οι παραπάνω ενώσεις είναι υψηλής τοξικότητας και έχει απαγορευτεί η χρήση τους.

B) Οργανικά: Τα οργανικά εντομοκτόνα αναλόγως της προέλευσής τους χωρίζονται, σε φυσικά και συνθετικά. Τα φυσικά είναι οργανικές ενώσεις φυτικής συνήθως προέλευσης (νικοτίνη, πύρεθρο, κ.τ.λ). Τα οργανικά συνθετικά εντομοκτόνα είναι αυτά που χρησιμοποιούνται ευρέως και κατατάσσονται σε διάφορες κατηγορίες ανάλογα με τη χημική τους δομή ή τον τρόπο δράσης τους. Τα οργανικά συνθετικά εντομοκτόνα διακρίνονται σε:

#### 3.3.1. Οργανοφωσφορικά

Η πλειοψηφία των οργανοφωσφορικών ενώσεων είναι εστέρες του φωσφορικού, θειονοφωσφορικού και φωσφονικού οξέος ή ανυδριτικά αλογονούχα και αμιδικά παράγωγα των παραπάνω οξέων.

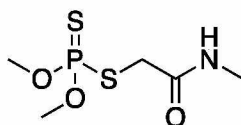


Ενδεικτικά περιλαμβάνονται τα παρακάτω:  
Φωσφορικοί εστέρες π.χ. dicrotophos  
Φωσφοροθειονικοί εστέρες π.χ. fenthion  
Φωσφοροδιθειονικοί εστέρες π.χ. malathion  
Φωσφοροθειολικοί εστέρες π.χ. demeton-S-methyl  
Φωσφονικοί εστέρες και Φωσφοραμιδικοί εστέρες  
Τρόπος δράσης

Τα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα ασκούν την εντομοκτόνο δράση τους στοχεύοντας στην παρεμπόδιση τη λειτουργίας ορισμένων σημαντικών ενζύμων του νευρικού συστήματος, των ακετυλ-χολινεστερασών (Hassall, 1990. Η ακετυλοχολίνη (acetylcholine, ACh), είναι ένας νευρικός διαβιβαστής, διεξάγει την χημική μεταφορά του ενεργού δυναμικού στην νευρική σύναψη και απομακρύνεται ενζυμικά μέσω υδρόλυσης από την ακετυλοχολινεστεράση (AChE). Τα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα είναι ικανά να σχηματίσουν ένα σταθερό σύμπλοκο-παρεμποδιστή του ενζύμου, φωσφορυλιώνοντας το μόριο της ακετυλοχολίνης (ACh).

Συσσωρεύεται έτσι ακετυλοχολίνη στις συνάψεις με αποτέλεσμα το θάνατο, στα θηλαστικά από παράλυση του αναπνευστικού συστήματος και στα έντομα από την παράλυση του νευρικού τους κέντρου (Μπαλαγιάννης, 1983). Για την καταπολέμηση του δάκου της ελιάς στην Ελλάδα, χρησιμοποιείται κυρίως από αυτή την κατηγορία το dimethoate και το phosmet όπως ακριβώς συστήνεται και από το αρμόδιο υπουργείο

[http://www.minagric.gr/syspest/SYSPEST\\_ENEMY\\_dron.aspx](http://www.minagric.gr/syspest/SYSPEST_ENEMY_dron.aspx)



**Εικόνα 3.1:** Χημική δομή του dimethoate

### 3.3.2. Πυρεθροειδή

Τα συνθετικά πυρεθροειδή που χρησιμοποιούνται σήμερα ευρέως, θεωρούνται ότι είναι συγγενείς ενώσεις με τις φυσικές πυρεθρίνες, τα οποία προήλθαν κατόπιν απομόνωσής τους από φυτά του γένους *Chrysanthemum* (χρυσάνθεμο), αλλά διακρίνονται από αυτά λόγω των βελτιωμένων φυσικοχημικών και βιολογικών ιδιοτήτων. Τα συνθετικά πυρεθροειδή μπορεί να είναι

Εστέρες χρυσανθεμικού οξέος με διάφορες αλκοόλες π.χ. allethrin

Εστέρες διαλογονομένων παραγώγων του χρυσανθεμικού οξέος με 3-φαίνοξυ-βενζυλική αλκοόλη ( π.χ. permethrin) ή με α - κυάνο-3-φαίνοξυ-βενζυλική αλκοόλη (π.χ.cypermethrin)

Εστέρες υποκατεστημένων αλειφατικών οξέων με αλκοόλες της προηγούμενης ομάδας ή άλλες όπως π.χ. fenvalerate, fluvalinate

Μη εστερικά πυρεθροειδή (etofenprox)

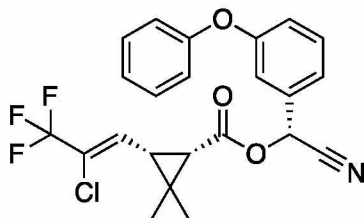
Τρόπος δράσης

Τα πυρεθροειδή δρουν στο περιφερικό σύστημα των εντόμων και κυρίως στην λειτουργία των αισθητήριων νευρώνων. Παρεμβαίνουν στην ομαλή λειτουργία των διόδων  $\text{Na}^+$  που ελέγχουν την εισροή και εκροή  $\text{Na}^+$  στα νευρικά κύτταρα με αποτέλεσμα απότομες νευρικές ώσεις και



τέλος το μπλοκάρισμα του νευρικού συστήματος. Είναι υπεύθυνα για την πρόκληση παράλυσης και του θανάτου των εντόμων ([http://eclass.uth.gr/eclass/modules/document/file.php/SGEA173/Insecticides\\_1.pdf](http://eclass.uth.gr/eclass/modules/document/file.php/SGEA173/Insecticides_1.pdf))

Για την καταπολέμηση του δάκου της ελιάς χρησιμοποιούνται κυρίως από αυτή την κατηγορία τα  $\alpha$ -cypermethrin,  $\beta$ -cyfluthrin, Deltamethrin,  $\lambda$ -Cyhalothrin,  $\zeta$ -cypermethrin όπως ακριβώς συστήνεται και από το αρμόδιο υπουργείο. ([http://www.minagric.gr/syspest/SYSPEST\\_ENEMY\\_dron.aspx](http://www.minagric.gr/syspest/SYSPEST_ENEMY_dron.aspx))



Εικόνα 3.2.:  $\lambda$ -Cyhalothrin

### 3.3.3. Οργανοχλωριωμένα

Τα οργανοχλωριωμένα εντομοκτόνα ανήκουν σε μία ομάδα εντομοκτόνων που εφαρμόστηκαν ευρέως στο παρελθόν, για να αντιμετωπιστούν τα έντομα που αποτελούσαν τους εχθρούς των καλλιεργειών, αλλά και αυτά υγειονομικής σημασίας (κουνούπια, ψείρες, κοριοί κ.α.). Θεωρούνται χλωριωμένοι υδρογονάνθρακες και ασκούν τη δράση τους διά επαφής, διότι λόγω της μεγάλης λιποδιαλυτότητάς τους, απορροφώνται γρήγορα από το δέρμα των εντόμων. Χαρακτηρίζονται από μεγάλη υπολειμματική δράση οπότε δεν διασπώνται στη φύση και παρατηρείται συσσώρευση στο λιπώδη ιστό των θηλαστικών, και αυτός είναι ο λόγος της απαγόρευσης των περισσότερων από αυτών. Το καθαρό DDT είναι λευκή κρυσταλλική σκόνη, κυκλοφόρησε στο εμπόριο και χρησιμοποιήθηκε για να αντιμετωπιστεί η ελονοσία σώζοντας εκατομμύρια ανθρώπους. Το DDT είχε αποτελέσει στο παρελθόν το πιο διαδεδομένο εντομοκτόνο σε ολόκληρο τον κόσμο. (Παπαδοπούλου, 1991, Snedeker, 2001).

Παρά την αποτελεσματικότητα του DDT, η χρήση του απαγορεύθηκε σε πολλές χώρες την δεκαετία του 1970, αφού διαπιστώθηκε ότι αποτελεί δηλητήριο των νευρών προκαλώντας λήθαργο, σύγχυση, τρέμουλο, σπασμούς. (Casarett and Doull's, 1996).

### 3.3.4. Νεονικοτινοειδή

Σε αυτή την κατηγορία εντομοκτόνων ανήκουν τα συνθετικά ανάλογα της φυσικής νικοτίνης που παράγεται από τον καπνό. Είναι εντομοκτόνα που εφαρμόζονται κυρίως στο έδαφος και μεταφέρονται σε όλο το φυτό προσφέροντας προστασία από μυζητικά έντομα.

#### Τρόπος δράσης

Ανταγωνίζονται με την ACh για την δέσμευση τους στους υποδοχείς της στις μετασυναπτικές μεμβράνες των χολινεργικών συνάψεων του κεντρικού νευρικού συστήματος των εντόμων. Τα νεονικοτινοειδή δεσμεύονται στους υποδοχείς της ACh με αποτέλεσμα το μπλοκάρισμα του κεντρικού νευρικού συστήματος των εντόμων και τον θάνατο (<http://eclass.uth.gr/eclass/modules/document/file.php/SGEA173/Insecticides%202.pdf>). Για

την καταπολέμηση του δάκου της ελιάς στην Ελλάδα, χρησιμοποιούνται κυρίως από αυτή την κατηγορία το Thiacloprid και το [Acetamiprid](#), όπως ακριβώς συστήνεται και από το αρμόδιο υπουργείο [http://www.minagric.gr/syspest/SYSPEST\\_ENEMY\\_dron.aspx](http://www.minagric.gr/syspest/SYSPEST_ENEMY_dron.aspx)

### 3.3.5. Καρβαμιδικά

Είναι παράγωγα του καρβαμικού οξέος. Έχουν τα πλεονεκτήματα ότι δρουν εναντίον μεγάλου φάσματος εντόμων ενώ έχουν πολύ χαμηλή παραμένουσα δράση και δεν συσσωρεύονται στους ζωικούς ιστούς. (<https://www.britannica.com/technology/insecticide>). Πιστεύεται ότι ο μηχανισμός δράσης τους είναι παρόμοιος με αυτόν των οργανοφωσφορικών ενώσεων, με την αναστολή του ενζύμου της χολινεστεράσης, αν και σε μικρότερο βαθμό. (Metcalf, 2002)

### 3.3.6. Spinosyns

Σχετικά νέα ομάδα ιδιαίτερα δραστικών φυσικών εντομοκτόνων που απομονώθηκαν το 1989 από καλλιέργειες του ακτινομύκητα *Saccharopolyspora spinose*. Τα δύο κύρια μέλη της ομάδας είναι τα Spinosyn A και Spinosyn D που έχουν εξίσου υψηλή εντομοκτόνο δράση και διατίθενται ως μίγμα (85:15) ως Spinosad.

Τρόπος δράσης

Δρα ως ανταγωνιστής της ACh στους υποδοχείς της ACh στις χολινεργικές συνάψεις προκαλώντας υπερδιέγερση του νευρικού συστήματος των εντόμων και οδηγεί στην παράλυση. Παρουσιάζει και κάποια ανασταλτική δράση στους υποδοχείς του GABA. Το Spinosad δρα σε διαφορετικό σημείο των νικοτινικών υποδοχέων της ACh σε σχέση με τα νεονικοτινοειδή εντομοκτόνα.

(<http://eclass.uth.gr/eclass/modules/document/file.php/SGEA173/Insecticides%202.pdf>)

Για την καταπολέμηση του δάκου της ελιάς στην Ελλάδα, χρησιμοποιείται το Spinosad όπως ακριβώς συστήνεται και από το αρμόδιο υπουργείο [http://www.minagric.gr/syspest/SYSPEST\\_ENEMY\\_dron.aspx](http://www.minagric.gr/syspest/SYSPEST_ENEMY_dron.aspx)

### 3.4. Φυτοπροστατευτικά προϊόντα και περιβάλλον

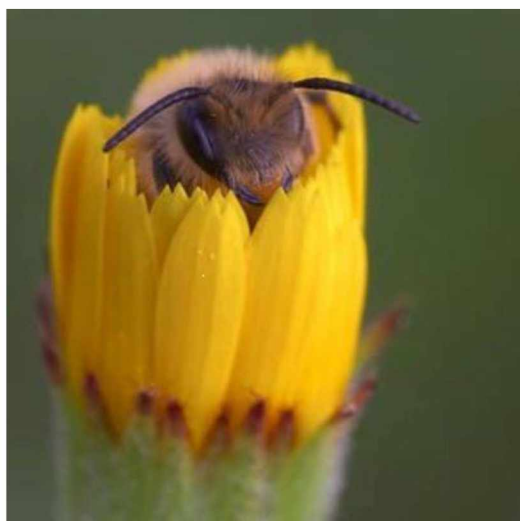
Τα τελευταία χρόνια εκφράζονται φόβοι για τις επιπτώσεις των φυτοπροστατευτικών προϊόντων στη ανθρώπινη υγεία, τις άμεσες αλλά και τις μακροχρόνιες δυσμενείς επιπτώσεις στο οικοσύστημα, από την μη ορθή χρήση αυτών.

Η αλόγιστη χρήση των φυτοπροστατευτικών προϊόντων είχε σαν αποτέλεσμα:

- Την διατάραξη της οικολογικής ισορροπίας
- Την ανάπτυξη διαφόρων ανθεκτικών μορφών φυτοπαρασίτων (έντομα, μύκητες, βακτήρια, ζιζάνια)
- Τη ρύπανση του περιβάλλοντος
- Την αύξηση τοξικών ουσιών σε υπόγεια νερά
- Τη ρύπανση των τροφίμων με τα υπολείμμά τους
- Την ακούσια καταστροφή ωφέλιμων εντόμων. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι τα φάρμακα αυτά ασκούν την τοξική τους δράση όχι μόνο στα ανεπιθύμητα παράσιτα, αλλά και στους ωφέλιμους οργανισμούς, όπως είναι οι μέλισσες, που δεν αποτελούν στόχους, αλλά

συνυπάρχουν στο περιβάλλον μαζί με τους ανεπιθύμητους οργανισμούς. Στην “σιωπηλή άνοιξη”, βιβλίο της Rachel Carson, διατυπώνονται οι πρώτες ανησυχίες στα μέσα της δεκαετίας του 50 όπου αποδεικνύεται η δραστική μείωση του πληθυσμού των πουλιών σε απέραντες περιοχές των Η.Π.Α. όπου έγιναν εκτεταμένες εφαρμογές του DDT. Τόσο η εφαρμογή των φυτοπροστατευτικών προϊόντων όσο και η αποθήκευσή τους απαιτεί προσεκτικούς χειρισμούς προκειμένου να επιφέρει το καλύτερο δυνατό αποτέλεσμα με το μικρότερο κόστος και με τις λιγότερες δυσμενείς συνέπειες στο περιβάλλον και στον άνθρωπο.

#### 4. Η ΜΕΛΙΣΣΑ



Εικόνα 4.1.: μέλισσα (φωτό από Aberto Rot Albarca)

##### 4.1. Συστηματική Κατάταξη

Η κοινή μέλισσα *Apis mellifera* (ή *mellifica*), είναι έντομο και η συστηματική της κατάταξη φαίνεται στον πίνακα 4.2.:

Βασίλειο	Ζώα
Φύλο	Αρθρόποδα
Κλάση	Έντομα
Τάξη	Υμενόπτερα
Οικογένεια	Μέλισσες
Γένος	<i>Apis</i>
Είδος	<i>mellifera</i> Linnaeus

Σύμφωνα με τον Otis (1991), στο γένος *Apis* υπάγονται 9 είδη : *Apis dorsata* Fabricius, *Apis laboriosa* F.Smith, *Apis binghami* Cockerell, *Apis breviligula* Maa, *Apis mellifera* L., *Apis cerana* Fabricius, *Apis koschevnikovi* Buttel-Reepen, *Apis florea* Fabricius, *Apis adeniformis* Smith. Προστέθηκε ακόμα ένα είδος τελευταία, το *Apis nuluensis* Tingek, Koeniger and Koeniger (Tingek et al., 1996)

Για την κατάταξη της μέλισσας (*Apis mellifera*) στις διάφορες φυλές (υποείδη), έχουν χρησιμοποιηθεί διάφορα κριτήρια όπως κάποια μορφολογικά γνωρίσματα, μιτοχονδριακό



DNA ή χαρακτηριστικά συμπεριφοράς. Στην Ελλάδα, καταγράφηκαν από τον Ruttner (1988), 4 φυλές μελισσών που σήμερα όμως δεν ξέρουμε ακριβώς ποιές από αυτές υπάρχουν και σε ποιές περιοχές βρίσκονται, εξαιτίας του υβριδισμού που προκλήθηκε από εισαγωγές ξένων βασιλισσών και από διακίνηση βασιλισσών και μελισσιών εντός της Ελλάδος. Οι ελληνικές φυλές που υπήρχαν είναι οι εξής :

Η Κρητική, τη συναντούμε στην Κρήτη, αλλά και μέλισσες των νησιών του Ανατολικού Αιγαίου μοιάζουν στη μέλισσα αυτή.

Η Μακεδονική, τη συναντούμε στη Μακεδονία, Θράκη, Ήπειρο και Θεσσαλία, και σε μικρότερο ποσοστό, ανατολική Ρουμανία, ένα μέρος Ρωσίας και Βουλγαρία.

Η Κεκρόπια, τη συναντούμε στα Βόρεια μέχρι τη γραμμή που σχηματίζεται από τα Ιωάννινα, Μέτσοβο και Καλαμπάκα. Προς τα Νότια τη συναντούμε σε Κεντρική και Νότια Ελλάδα καθώς και στην Πελοπόννησο.

Η Καρνιολική, τη συναντούμε στα νησιά του Ιονίου Πελάγους. (Χαριζάνης Χρ. Πασχάλης, 2014)

#### 4.2. Βιολογικός κύκλος

Η μέλισσα για να ολοκληρώσει την ανάπτυξή της και να γίνει ενήλικη, διέρχεται από 3 άλλα στάδια: το αυγό, την προνύμφη (larva) και τη νύμφη ή πλαγγόνα (pupa).

Η βασίλισσα ωοτοκεί σε βασιλικά κελλιά και σε κελλιά εργατριών ή κηφήνων. Τα γονιμοποιημένα αυγά αναπτύσσονται είτε σε εργάτριες είτε σε βασίλισσες, ενώ τα αγονιμοποιημένα αυγά αναπτύσσονται σε κηφήνες. Κατά το στάδιο της προνύμφης η βασίλισσα τρέφεται με βασιλικό πολτό, γι' αυτό αναπτύσσεται πολύ γρήγορα και αποκτά μεγάλο βάρος. Αυτές οι αλλαγές συμβαίνουν όταν τα κελιά είναι ασφράγιστα. Μετά, οι εργάτριες σφραγίζουν τα κελιά και μέσα στο κελί οι προνύμφες πλέκουν ένα κουκούλι και μεταμορφώνονται σε νύμφες. Όταν η ανάπτυξη ολοκληρωθεί, τότε η μέλισσα μέσα από το κελί ανοίγει το σφράγισμα και εξέρχεται. Για να ολοκληρωθεί η ανάπτυξη της μέλισσας από το αυγό μέχρι το ενήλικο, απαιτούνται για τη βασίλισσα 16 ημέρες, για την εργάτρια 21 ημέρες και για τον κηφήνα 24 ημέρες.

Το αυγό είναι στενόμακρο, αποστρογγυλευμένο στις δύο άκρες, ελαφρά κυρτό με χρώμα γαλακτώδες. Στη μία άκρη έχει ένα πολύ μικρό άνοιγμα, τη μικροπύλη, από όπου εισέρχεται το σπερματοζωάριο για να το γονιμοποιήσει. Με κάποιον τρόπο από τα αυγά των μελισσών εκκολάπτονται οι προνύμφες και αναπτύσσονται κανονικά, είτε είναι είτε δεν είναι γονιμοποιημένα. Το αυγό από την ώρα που θα γεννηθεί, χρειάζεται 3 ημέρες, μέχρι την εκκόλαψη της προνύμφης. (Χαριζάνης Χρ. Πασχάλης, 2014)

#### 4.3. Η διατροφή της μέλισσας

Η μέλισσα, απαιτεί απαραίτητα συστατικά προκειμένου να επιβιώσει και να αναπαραχθεί. Επιπλέον αυτά τα συστατικά θα πρέπει να βρίσκονται στην σωστή ποσότητα και αναλογία. Αυτά τα συστατικά περιλαμβάνουν :

Υδατάνθρακες, οι οποίοι μετατρέπονται σε γλυκόζη από την οποία παράγεται ATP, το καύσιμο σχεδόν όλων των κυττάρων. Η μέλισσα μπορεί και χρησιμοποιεί, σακχαρόζη

(ζάχαρη), μαλτόζη και τρεχαλόζη, που είναι οι κύριοι δισακχαρίτες του νέκταρος και των μελιτωμάτων και μελιζιτόζη που είναι τρισακχαρίτης (Huang, 2012).

Πρωτεΐνες, για την ανάπτυξη μυών, αδένων και ιστών, για την παραγωγή εργατικού ή βασιλικού πολτού και κεριού. Η γύρη που συλλέγεται από τις μέλισσες και που την αποθηκεύουν ως "μελισσόψωμο" που καταναλώνεται από τις νεαρές εργάτριες κυρίως, είναι πλούσια σε πρωτεΐνες.

Βιταμίνες, για να συνθέσει άλλες πολύπλοκες ουσίες και να ρυθμίσει λειτουργίες του σώματός της. Προέρχονται κυρίως από τη γύρη που συλλέγει, και είναι πρωταρχικά βιταμίνες του συμπλέγματος Β, όπως θειαμίνη, πυριδοξίνη και άλλες απαραίτητες στα περισσότερα έντομα (Dadd, 1973)

Λιπίδια, ως πηγή ενέργειας, για σύνθεση αποθεμάτων λίπους και γλυκογόνου αλλά και ως δομικό συστατικό κυτταρικών μεμβρανών. Οι απαιτήσεις σε λιπίδια ικανοποιούνται με την κατανάλωση γύρης.

Ανόργανα συστατικά, τα οποία τα εφοδιάζεται από τη γύρη, το νέκταρ, τα μελιτώματα και το νερό. Τα συστατικά αυτά χρειάζονται σε όλες τις ζωτικές λειτουργίες της μέλισσας. Τα συστατικά που συναντούμε περισσότερο στο σώμα τις μέλισσας είναι ο φωσφόρος και το κάλιο, ενώ το ασβέστιο, το νάτριο, το μαγνήσιο και ο σίδηρος απατώνται σε λιγότερες ποσότητες.

Νερό, το οποίο προέρχεται είτε από το νέκταρ είτε συλλέγεται από έξω. Το νερό χρειάζεται για την αραίωση του μελιού, τη διατροφή του γόνου και πολλές άλλες διεργασίες. Επίσης είναι απαραίτητο για τη διατήρηση της υγρασίας μέσα στη γονοφωλιά, ώστε να εξασφαλιστεί η επώαση των αυγών και να αποφευχθεί η αφυδάτωση των προνυμφών. (Χαριζάνης Χρ. Πασχάλης, 2014)

#### 4.4. Μέλισσα και επικονίαση

Οι μέλισσες καθώς επισκέπτονται τα άνθη για τη συλλογή τροφής, επικονιάζουν εκατοντάδες διαφορετικά είδη φυτών. Είναι μια αμοιβαία σχέση αφού τα άνθη προσφέρουν νέκταρ και γύρη στις μέλισσες και οι μέλισσες με τη σειρά τους εξασφαλίζουν την επικονιάσή τους. (με τον όρο επικονίαση εννοούμε την μεταφορά της γύρης από τον ανθήρα ενός άνθους στο στίγμα του ίδιου ή άλλου άνθους).

Η μέλισσα όμως δεν είναι και ο μοναδικός επικονιαστής των φυτών. Σε αυτή τη διαδικασία συνεισφέρει και ο άνεμος, το νερό, άλλα έντομα, πουλιά κ.ά. Η μέλισσα όμως είναι το σημαντικότερο έντομο για την επικονίαση γιατί βρίσκεται σε μεγάλους πληθυσμούς σε όλον τον κόσμο, είναι δραστήρια όλο τον χρόνο, είναι έντομο με πολύ καλά μελετημένη βιολογία και μπορεί ο άνθρωπος να την εκμεταλλευτεί προς όφελός του. Επίσης μπορεί να μεταφερθεί σε πολύ μεγάλες αποστάσεις και τη χαρακτηρίζει η ανθική σταθερότητα (δηλαδή η μεταφορά γύρης από ένα είδος κάθε φορά οπότε μεγιστοποιείται και η επικονίαση). (Χαριζάνης Χρ. Πασχάλης, 2014)

#### 4.5. Προϊόντα της κυψέλης

Η μέλισσα παράγει έξι προϊόντα που χρησιμοποιεί ο άνθρωπος: μέλι, γύρη, πρόπολη, κερί, βασιλικό πολτό και δηλητήριο. Για τα τρία πρώτα χρησιμοποιεί πρώτες ύλες από τη φύση, ενώ για τα υπόλοιπα χρησιμοποιεί τους αδένες του σώματός της.



Εικόνα 4.2.: μέλισσες σε κηρήθρα

Το **μέλι** είναι το τρόφιμο που συλλέγουν οι μέλισσες από τα ζωντανά μέρη των φυτών ή από εκκρίσεις εντόμων, που μεταφέρουν στην κυψέλη τους, μεταποιούν, εμπλουτίζουν με δικές τους ουσίες και αποθηκεύουν στις κηρήθρες τους μέχρι να ωριμάσει. Το μέλι είναι ένα υπέρκορο διάλυμα σακχάρων που περιέχει κι άλλες ουσίες όπως ανόργανα συστατικά, ένζυμα, οργανικά οξέα κ.ά. Είναι η μόνη γλυκιά ουσία που δεν χρειάζεται περαιτέρω χειρισμό και επεξεργασία για να καταστεί έτοιμη προς βρώση.

Το **κερί**, είναι προϊόν που παράγουν οι νεαρές εργάτριες ηλικίας 2 έως 3 εβδομάδων στα 4 ζεύγη κηρογόνων αδένων που βρίσκονται κάτω στην κοιλιά τους. Οι μέλισσες συνθέτουν το κερί καταναλώνοντας σιρόπι ή μέλι και μία μικρή ποσότητα πρωτεϊνών. Το καθαρό κερί έχει χρώμα άσπρο. Το κίτρινο χρώμα του στις κηρήθρες οφείλεται στα λιποδιαλυτά καροτενοειδή που περιέχονται στη γύρη. Το κερί είναι πολύπλοκο μίγμα από 300 περίπου ουσίες και κατά μέσο όρο περιέχει:

16% υδατάνθρακες, 31% μονοϋδρικές ακοόλες, 31% λιπαρά οξέα, 13% υδρόξυ-οξέα, 3% διόλες. (Χαριζάνης Χρ. Πασχάλης, 2014)

#### 4.6. Δηλητηριάσεις μελισσών από φυτοπροστατευτικά προϊόντα

Οι δηλητηριάσεις των μελισσών αποτελούν μία από τις πιο σημαντικές αιτίες απώλειας των μελισσών. Ανάλογα με την προέλευσή τους διακρίνονται σε: χημικές δηλητηριάσεις από γεωργικά φάρμακα (με εφαρμογή εντομοκτόνων στις καλλιέργειες κατά τη διάρκεια της ανθοφορίας, με μεταφορά εντομοκτόνων με τον άνεμο σε ανθισμένες καλλιέργειες ή μελισσοκομεία, με τον ψεκασμό της ανθισμένης άγριας βλάστησης που βρίσκεται κάτω από την καλλιέργεια ή ακόμα και όταν οι μέλισσες έρχονται σε επαφή με υπολείμματα εντομοκτόνων που βρίσκονται πάνω στα φυτά ή το νερό). Τα γεωργικά φάρμακα μπορούν να εισέλθουν στο σώμα της μέλισσας είτε από το στόμα είτε από το αναπνευστικό σύστημα. Διά της πεπτικής οδού τα φάρμακα επηρεάζουν την ικανότητα λήψης τροφής της μέλισσας και

έτσι αυτή δεν μπορεί να τραφεί ή μπορούν αν επηρεάσουν το νευρικό σύστημα έτσι ώστε να μη μπορούν να λειτουργήσουν πόδια και φτερά. Ο θάνατος μπορεί να είναι άμεσος ή λίγο αργότερα, οπότε οι μέλισσες πεθαίνουν έξω, μέσα ή μπροστά στην κυψέλη τους. Επίσης, τα γεωργικά φάρμακα μπορεί να έχουν αργή δράση διακόπτοντας την ωοτοκία της βασίλισσας, αλλάζοντας τη συμπεριφορά των μελισσών ή προκαλώντας λιμοκτονία ή ψύξη του γόνου.

χημικές δηλητηριάσεις από λανθασμένη χρήση μελισσοφαρμάκων και

χημικές δηλητηριάσεις από κατάλοιπα βιομηχανιών.

Επίσης έχουμε τις φυτικές δηλητηριάσεις που αφορούν σε δηλητηριάσεις μελισσών μετά από κατανάλωση γύρης, νέκταρος ή μελιτοεκκριμάτων ορισμένων φυτών τα οποία παρουσιάζουν τοξικές ιδιότητες για τις μέλισσες. (Χαριζάνης Χρ. Πασχάλης, 2014)

**Η μελισσοτοξικότητα** ενός παρασιτοκτόνου είναι συνήθως ανάλογη της εντομοτοξικής του δράσης και αποτελεί παράγοντα που πρέπει να δίνεται ιδιαίτερη προσοχή κατά την εφαρμογή του ιδιαίτερα σε ανθισμένα φυτά, καλλιεργούμενα ή αυτοφυή. Η μελισσοτοξικότητα ενός παρασιτοκτόνου εκτιμάται με πειράματα εργαστηρίου και αγρού, όπου εξετάζεται η τοξικότητα αυτού κατά την με επαφή ή μετά από πρόσληψη με την τροφή. Ανάλογα με το βαθμό μελισσοτοξικότητας, τα παρασιτοκτόνα ταξινομούνται σε τρεις κατηγορίες:

**Πολύ τοξικά :** στα οποία απαγορεύεται η χρήση τους στην ανθοφορία, τηρείται απόσταση ασφαλείας τουλάχιστον 50 m από τις κυψέλες και τα ψεκαζόμενα φυτά είναι ασφαλή για τις μέλισσες 2-3 ημέρες μετά τον ψεκασμό τους

**Μετρίως τοξικά :** στα οποία πρέπει να αποφεύγεται η χρήση τους στην ανθοφορία ή να εφαρμόζονται κατά τις βραδινές ώρες (όταν δεν πετούν οι μέλισσες), τηρείται απόσταση ασφαλείας 50 m από τις κυψέλες και τα φυτά είναι ασφαλή 4-6 ώρες μετά τον ψεκασμό

**Σχετικά μη τοξικά :** τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε απόσταση τουλάχιστον 5 m από τις κυψέλες, στην ανθοφορία αλλά όχι κατά τις ώρες που πετούν οι μέλισσες (νωρίς το πρωί ή αργά το βράδυ).

#### Τοξικότητα των φυτοπροστατευτικών ουσιών- κατηγορίες

Για τη διάκριση της τοξικότητας των διαφόρων φυτο-προστατευτικών προϊόντων χρησιμοποιείται ο δείκτης LD50, η μέση θανατηφόρος δόση. Βάσει αυτού οι διάφορες ουσίες κατηγοριοποιούνται σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα (κατηγορία I περισσότερο τοξικά)

ΚΑΤΗΓΟΡΙΑ	ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ	ΜΕΣΗ ΘΑΝΑΤΗΦΟΡΟΣ ΔΟΣΗ
I	Πολύ τοξικά	LD50 < 2μg/bee
II	Μετρίως τοξικά	2μg < LD50 < 10,99 μg/ bee
III	Ελαφρώς τοξικά	11μg < LD50 < 100 μg/bee
IV	Μη τοξικά	100μg/bee < LD50

Χαρακτηριστικά αναφέρεται ότι ο αριθμός των νεκρών μελισσών ανά ημέρα μπροστά στη κυψέλη είναι ενδεικτικός για τη σοβαρότητα της δηλητηρίασης που έχει επέλθει στο σμήνος. Για παράδειγμα σε εποχές πλήρους δραστηριότητας και μεγάλης ανάπτυξης του σμήνους:

0 - 100 νεκρές μέλισσες την ημέρα δηλώνουν φυσιολογικό θάνατο,

200 - 400 νεκρές μέλισσες την ημέρα δηλώνουν χαμηλή τοξικότητα,

500 - 900 νεκρές μέλισσες την ημέρα δηλώνουν μέτρια τοξικότητα,

1000 ή περισσότερες νεκρές μέλισσες την ημέρα δηλώνουν υψηλή τοξικότητα

Για την προστασία των μελισσών από τα φυτο-προστατευτικά προϊόντα υπάρχει συγκεκριμένη Ευρωπαϊκή και Εθνική νομοθεσία (για παράδειγμα το ΠΔ 115/97). Η μέλισσα αποτελεί έναν από τους πλέον σημαντικούς δείκτες τοξικότητας κάποιας ουσίας. Έτσι οποιαδήποτε αρνητική επίδραση κάποιας ουσίας βρεθεί στις μέλισσες, η ουσία αυτή δεν μπορεί να εγκριθεί για χρήση. Επιπλέον, όλα τα εμπορικά σκευάσματα πρέπει να αναγράφουν την κατηγορία τοξικότητας στην ετικέτα τους με ευανάγνωστα γράμματα. Τέλος πρέπει να τηρούνται τα εξής από τους καλλιεργητές

- Χρήση των λιγότερο τοξικών σκευασμάτων
- Χρήση των σκευασμάτων που έχουν την μικρότερη υπολειμματική δράση (σε ώρες)
- Εφαρμογή ψεκασμών πριν την ανθοφορία
- Εφαρμογή ψεκασμών αργά το απόγευμα ή το βράδυ
- Αυστηρή εφαρμογή των ψεκασμών σύμφωνα με τις οδηγίες χρήσης κάθε σκευάσματος
- Προειδοποίηση του μελισσοκόμου για τον επικείμενο ψεκασμό
- Κόψιμο των ζιζανίων για να μην υπάρχει η ανάγκη ψεκασμών τους
- Κόψιμο των ανθισμένων ζιζανίων για να μην τα επισκέπτονται οι μέλισσες όταν δεν επισκέπτονται ακόμα τη μη ανθισμένη καλλιέργεια που ψεκάζεται
- Χρήση φυτο-προστατευτικών προϊόντων όταν είναι απολύτως απαραίτητα και όχι για προληπτικούς λόγους (Φανή Χατζήνα, <http://www.melinet.gr/item/fitopharmaka2007.pdf>)
- Οι μελισσοκόμοι, προτείνεται να παίρνουν τις εξής προφυλάξεις:
- Μεταφορά μελισσοκομείου σε άλλη καλλιέργεια ή περιοχή, εφόσον έχει ειδοποιηθεί ή γνωρίζει τότε θα προκύψει το πρόβλημα
- Περιορισμός μελισσών στις κυψέλες τους είτε με ειδικά υγρά σκεπάσματα (λινάτσες) είτε ψεκάζοντας με νερό μπροστά στις κυψέλες για την ημέρα ή τις ημέρες που ακολουθούν τον ψεκασμό
- Πρέπει να δηλώνεται η θέση του μελισσοκομείου στους Δήμους, στα Κέντρα Γεωργικών Εφαρμογών και να αναγράφεται στις κυψέλες κάποιο τηλέφωνο για άμεση επικοινωνία
- Τοποθέτηση μελισσοκομείων, σε σχέση με την καλλιέργεια, σε πλευρές από τις οποίες φυσάει συνήθως και όχι προς τα εκεί που φυσάει ο άνεμος
- Μη επιστροφή των κυψελών σε καλλιέργεια που έχει ψεκάστεί με πολύ τοξικό φυτοφάρμακο αν δεν περάσουν πρώτα τουλάχιστον 2 ή περισσότερες ημέρες
- Χρησιμοποίηση πολύ δυνατών μελισσοσμηνών για να μπορούν να ανακάμπτουν γρηγορότερα
- Να αποφεύγονται οι περιοχές ή οι καλλιέργειες που συνήθως ψεκάζονται με πολύ τοξικά σκευάσματα (Φανή Χατζήνα, 2007)



5. Ανίχνευση και ποσοτικός προσδιορισμός φυτοφαρμάκων με υγρή χρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μαζών σε σειρά (LC-MS/MS) και αέρια χρωματογραφία δίδυμης φασματομετρίας μαζών (GC-MS/MS)

#### 5.1. Κατεργασία δείγματος

Η σημαντικότερη διαδικασία σε μία χρωματογραφική ανάλυση, είναι η σωστή κατεργασία ενός δείγματος με σκοπό την παραλαβή ενός κλάσματος, όσο το δυνατόν καθαρό από παρεμποδίζουσες ουσίες της μήτρας, κατάλληλο για έγχυση στη χρωματογραφική στήλη. Έτσι, αναπτύσσονται και βελτιστοποιούνται συνεχώς τεχνικές που στοχεύουν στη μείωση του όγκου των διαλυτών που χρησιμοποιούνται, στη μείωση των σταδίων καθαρισμού και φυσικά την ασφάλεια του αναλυτή χωρίς να επηρεάζεται η αναπαραγωγιμότητα και η ακρίβεια των αποτελεσμάτων.

##### 5.1.1. Τεχνική QuEChERS

Η τεχνική QuEChERS η οποία δημοσιεύθηκε το 2003 από τους Anastassiades et al., χρησιμοποιείται για την κατεργασία δειγμάτων για την ανίχνευση καταλοίπων φυτοφαρμάκων στα τρόφιμα. Αποτελεί ακρωνύμιο των λέξεων ‘Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe’ που σημαίνει, γρήγορη, εύκολη, οικονομική, αποτελεσματική, ανθεκτική και ασφαλής και από τότε έχει εξελιχθεί και τροποποιηθεί ώστε να εφαρμόζεται και σε μήτρες εκτός των φρούτων και λαχανικών (Usui et al., 2012) αλλά και για τον προσδιορισμό άλλων καταλοίπων όπως κτηνιατρικά (R. P. Lopes et al, 2012), πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες (PAHs) (A. Sadowska-Rociek et al., 2013) κ.α.

Επίσης η τεχνική είναι συμβατή τόσο με αέρια χρωματογραφία όσο και με υγρή χρωματογραφία, ο όγκος των διαλυτών και αποβλήτων είναι μικρός, απαιτείται ελάχιστος εργαστηριακός εξοπλισμός και λίγος χώρος για την κατεργασία και δεν απαιτούνται ιδιαίτερες ικανότητες και εκπαίδευση για τον αναλυτή ώστε να πραγματοποιήσει την κατεργασία. (H. L. Martinez Vidal, A. Garrido Frenich, 2005)

Η διαδικασία αποτελείται από δύο στάδια: Το δείγμα αρχικά αφού ομογενοποιείται, εκχυλίζεται με τη χρήση ενός οργανικού διαλύτη (π.χ. ακετονιτρίλιο) και ταυτόχρονα ακολουθεί υγρή-υγρή κατανομή (liquid-liquid partitioning) παρουσία μεγάλων ποσοτήτων αλάτων όπως άνυδρο θειικό μαγνήσιο ( $\text{MgSO}_4$ ) και χλωριούχο νάτριο ( $\text{NaCl}$ ). Ακολούθως το δείγμα ανακινείται για κάποιο χρονικό διάστημα και φυγοκεντρείται. Στη συνέχεια το υπερκείμενο εκχυλίζεται περαιτέρω και καθαρίζεται με την τεχνική της εκχύλισης διασποράς στερεάς φάσεως (dispersive solid phase extraction, d-SPE) με την παρουσία μικρής ποσότητας προσροφητικής ουσίας (primary-secondary amine, PSA) και άνυδρου θειικού μαγνησίου ( $\text{MgSO}_4$ ). Κατά τη διάρκεια της δεύτερης εκχύλισης απομακρύνονται η περίσσεια του νερού και τα συστατικά της μήτρας. Ακολουθεί και πάλι ανακίνηση και φυγοκέντρωση του δείγματος. Στο υπερκείμενο υγρό που προκύπτει, ρυθμίζεται το pH και υποβάλλεται σε ανάλυση είτε με αέρια χρωματογραφία είτε με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης. (Anastassiades et al., 2003). Το ακετονιτρίλιο επιλέχθηκε γιατί διαχωρίζεται πιο εύκολα και

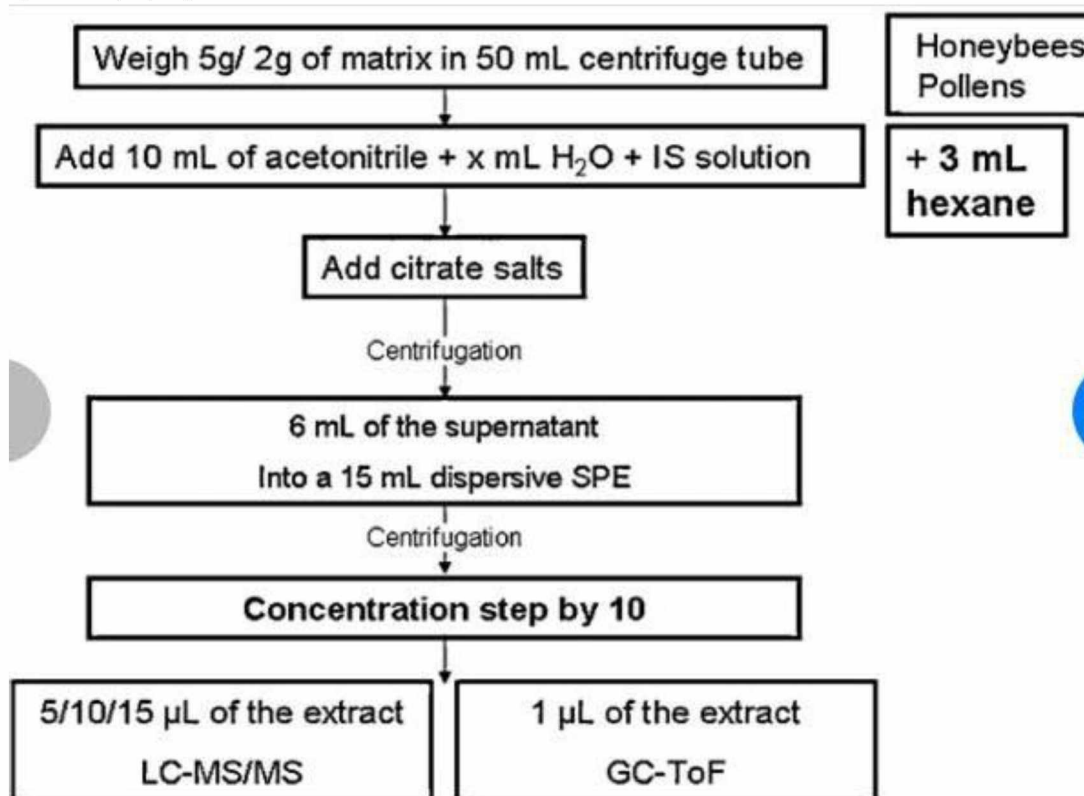
πιο αποτελεσματικά από το νερό σε σχέση με την ακετόνη, παρουσία αλάτων (Schenck, F.J. et al., 2002; Steinwandter, H., 1992).

Η προσθήκη  $\text{MgSO}_4$  (4gr ανά 10 gr δείγματος) και  $\text{NaCl}$  (1 gr) κατά το στάδιο της εκχύλισης, έχει σκοπό τον καλύτερο διαχωρισμό των φάσεων αλλά και την μέγιστη ανάκτηση των φυτοφαρμάκων του δείγματος. Το θειικό μαγνήσιο ( $\text{MgSO}_4$ ) μειώνει τον όγκο της υδατικής φάσης βοηθώντας την κατανομή των πολικών αναλυτών στην οργανική φάση. Το χλωριούχο νάτριο ( $\text{NaCl}$ ) βελτιώνει την εκλεκτικότητα της εκχύλισης καθώς με μεταβολή της ποσότητας αυτού δύναται να ελεγχθεί η πολικότητα της μεθόδου και επομένως η ποσότητα των παρεμβαλλόμενων ουσιών της μήτρας στο εκχύλισμα. (Anastassiades et al., 2003)

#### Πρωτόκολλο Wiest

Από το 2003 που δημοσιεύθηκε η τεχνική QuEChERS από τους Anastassiades et al., έχουν τροποποιηθεί βήματα στην εκτέλεσή της προκειμένου να εφαρμόζεται με επιτυχία και ακρίβεια σε μήτρες εκτός τροφίμων αλλά και για ανίχνευση διαφορετικών από τα φυτοφάρμακα ουσιών. Έτσι το 2005, οι Lehotay et al. πρόσθεσαν οξικά άλατα σαν ρυθμιστικό μέσο στην πρώτη εκχύλιση αλλά και για να προστατέψουν τα ευαίσθητα φυτοφάρμακα ώστε η ανάκτησή τους να είναι όσο το δυνατόν καλύτερη. Το 2008, οι Przybylski et al., προσθέτουν στο πρώτο βήμα μαζί με το  $\text{MeCN}$ ,  $n\text{-Hexane}$ , κατά την κατεργασία υποστρωμάτων με υψηλά ποσοστά λιπιδίων, προκειμένου να τα απομακρύνουν. Το 2006, οι Leandro et al. στο δεύτερο βήμα της QuEChERS χρησιμοποίησαν PSA και octadecyl bonded silica (PSA/C18) προκειμένου να περιορίσουν στο ελάχιστο τις μη πολικές παρεμβάσεις της μήτρας.

Οι παραπάνω τροποποιήσεις συγκεντρώθηκαν στη αναλυτική μέθοδο που εφάρμοσαν το 2011 οι L. Wiest et al., και είναι οι τροποποιήσεις στην QuEChERS που ακολουθήσαμε κι εμείς στο πειραματικό μέρος.



Πίνακας 5.1.: προκατεργασία δείγματος Weist βασισμένη στην QuEChERS. (Wiest et al., 2011)

## 5.2. Εισαγωγή στις χρωματογραφικές τεχνικές

Η χρωματογραφία είναι μία πανίσχυρη τεχνική διαχωρισμού και καθαρισμού διαφόρων ενώσεων, η οποία έχει ποικίλες εφαρμογές σε αρκετούς επιστημονικούς κλάδους. Εφευρέθηκε στις αρχές του 20ου αιώνα από τον Ρώσο βοτανολόγο Mikhail Tswett, ο οποίος χρησιμοποίησε την τεχνική για να διαχωρίσει διάφορες φυτικές χρωστικές, όπως οι χλωροφύλλες και οι ξανθοφύλλες.

Η ικανότητα διαχωρισμού διαφόρων ουσιών με τη βοήθεια της χρωματογραφίας στηρίζεται στην διαφορετική κατανομή των συστατικών ενός μίγματος μεταξύ δύο μη μιγνυόμενων φάσεων, μιας κινητής (mobile phase) και μια στατικής φάσης (stationary phase).

Ο διαχωρισμός βασίζεται στις διαφορές, που υπάρχουν σε ορισμένες ιδιότητες των συστατικών ενός μίγματος, όπως είναι το σημείο ζέσεως, η πολικότητα, τα ηλεκτρικά φορτία (για ιονικές ενώσεις), το μέγεθος των μορίων κ.α. Οι διαφορές αυτές διαφοροποιούν τη σχετική φυσικοχημική συγγένεια κάθε συστατικού προς τις δύο φάσεις.

### 5.2.1. Είδη χρωματογραφικών τεχνικών

Οι τεχνικές αυτές διαφέρουν ως προς τη φύση της κινητής φάσεως, ως προς το μηχανισμό, στον οποίο οφείλεται ο διαχωρισμός και ως προς τον τρόπο εισαγωγής του δείγματος στη στατική φάση και κινήσεώς του μέσα απ' αυτή. Έτσι η ταξινόμηση μπορεί να γίνει:

1) Με βάση τη φύση της κινητής και στατικής φάσεως: Ταξινομούνται σε υγρή χρωματογραφία (LC) και αέρια χρωματογραφία (GC), αναλόγως του εάν η κινητή φάση είναι υγρή ή αέρια. Οι δύο αυτές τάξεις υποδιαιρούνται παραπέρα ανάλογα με τη φύση της στατικής φάσεως, που μπορεί να είναι στερεή ή υγρή επάνω σε στερεό αδρανές φορέα. Έτσι, διακρίνονται σε υγρή-στερεή χρωματογραφία (LSC), υγρή-υγρή χρωματογραφία (LLC), αέρια-στερεή χρωματογραφία (GSC), και αέρια-υγρή χρωματογραφία (GLC).

2) Με βάση το μηχανισμό διαχωρισμού: Ταξινομούνται στις ακόλουθες πέντε τάξεις, ανάλογα με το μηχανισμό, με τον οποίο τα συστατικά του μίγματος κατακρατούνται από τη στατική φάση και γίνεται έτσι δυνατός ο διαχωρισμός:

α) Χρωματογραφία προσροφήσεως, β) Χρωματογραφία ιονανταλλαγής, γ) Χρωματογραφία κατανομής, δ) Χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού, ε) Χρωματογραφία συγγενείας

3) Με βάση τη φυσική μορφή της στατικής φάσεως:

α) χρωματογραφία στήλης: i) χρωματογραφία πληρωμένων στηλών ii) χρωματογραφία ανοικτών τριχοειδών στηλών

β) επίπεδη χρωματογραφία: i) χρωματογραφία χάρτου ii) χρωματογραφία λεπτής στιβάδας

4) Με βάση τον τρόπο εισαγωγής και κινήσεως του δείγματος:

α) μετωπική χρωματογραφία ( το διάλυμα του δείγματος εισάγεται στη στήλη συνεχώς και ο διαλύτης δρ. και ως κινητή φάση. Τα συστατικά του δείγματος εξέρχονται από τη στήλη με τη μορφή μετώπων)

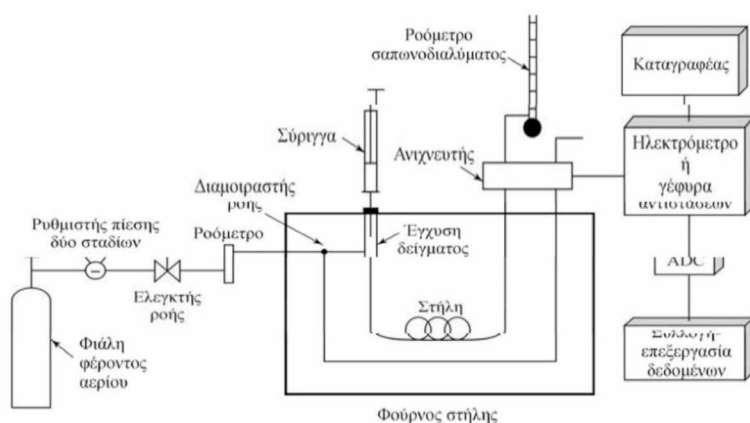
β) χρωματογραφία εκτοπίσεως (χρησιμοποιείται κινητή φάση που συγκρατείται ισχυρώς από τη στατική φάση, εκτοπίζοντας έτσι σε διάφορο βαθμό τα συστατικά του δείγματος μέσα από τη στήλη)

γ) χρωματογραφία εκλούσεως (τα συστατικά του δείγματος μεταφέρονται από την κινητή φάση με διαφορετική ταχύτητα κατά μήκος της στατικής φάσης, οπότε εξέρχονται από τη στήλη σε διαφορετικούς χρόνους) ( Χατζηιωάννου, Θ.Π & Κουμπάρης, Μ.Α,1990)

### 5.3. Αέρια Χρωματογραφία (Gas Chromatography – GC)

Η Αέρια Χρωματογραφία, αποτελεί δημοφιλή μέθοδο διαχωρισμού λόγω των χαρακτηριστικών που τη διακρίνουν, όπως η υψηλή επιλεκτικότητα, η ακρίβεια και η επαναληψιμότητα. Εφαρμόζεται κυρίως σε αναλυτική κλίμακα, δηλαδή σε ποσότητες δειγμάτων μικρότερες από  $10^{-6}$ g, και οι ενώσεις πρέπει να είναι ή να καθίστανται πτητικές. Στην αερια χρωματογραφία το δείγμα εξατμίζεται και εγχέεται στην κεφαλή μιας χρωματογραφικής στήλης. Η έκλυση πραγματοποιείται με ροή αδρανούς αερίου, το οποίο αποτελεί την κινητή φάση, η οποία δεν αλληλεπιδρά με τα μόρια του αναλύτη. Ο ρόλος της είναι η μετακίνηση του αναλύτη κατά μήκος της στήλης. Η χρωματογραφία αερίου-στερεού βασίζεται στη χρήση στερεάς στατικής φάσης, όπου η κατακράτηση των αναλυτών είναι αποτέλεσμα φυσικής προσρόφησης. Η χρωματογραφία αερίου-υγρού (η πιο διαδεδομένη σήμερα), βασίζεται στην κατανομή του αναλύτη μεταξύ της αέριας κινητής και μιας υγρής φάσης, η οποία είναι ακινητοποιημένη στην επιφάνεια ενός αδρανούς στερεού. (Skoog et.al., 2005)

#### 5.3.1. Οργανολογία αέριας-υγρής χρωματογραφίας



Εικόνα 5.2.: διάγραμμα ενός αέριοχρωματογράφου (Skoog et.al., 2005)

#### Φιάλη φέροντος αερίου

Στα φέροντα αέρια περιλαμβάνονται το ήλιο, άζωτο και υδρογόνο, τα χημικώς αδρανή αέρια. Η επιλογή του φέροντος αερίου καθορίζεται από τον τύπο του χρησιμοποιούμενου ανιχνευτή. Το σύστημα παροχής αερίου περιλαμβάνει **ρυθμιστές πίεσης**, μανόμετρα και ροόμετρα. Οι ταχύτητες ροής ρυθμίζονται με ρυθμιστές πίεσης δύο σταδίων οι οποίοι προσαρμόζονται στη φιάλη αερίου και με κάποιο είδος ρυθμιστή πίεσης ή ελεγκτή ροής προσαρμοσμένου στον χρωματογράφο. Οι πιέσεις στο στόμιο εισόδου κυμαίνονται από 10 έως 50 psi πάνω από την

πίεση του περιβάλλοντος και οδηγούν σε ταχύτητες ροής, 25 έως 150 ml/min σε “πακεταρισμένες” στήλες και 1 έως 25 ml/min σε στήλες ανοικτού σωλήνα (τριχοειδείς στήλες). Το **ροόμετρο** χρησιμεύει στην μέτρηση των ταχυτήτων αυτών. Όμως προκειμένου να έχουμε περισσότερη ακρίβεια στην μέτρηση αυτή τοποθετείται στην έξοδο της στήλης ένα **ροόμετρο σαπωνοδιαλύματος**.

### **Σύστημα έγχυσης δείγματος**

Η συνηθέστερη τεχνική έγχυσης είναι η ένεση του υγρού ή αερίου δείγματος με μικροσύριγγα, μέσω ενός αυτοσφραγιζόμενου ελαστικού διαφράγματος σιλικόνης, γνωστού ως septum. Το δείγμα εισέρχεται από το στόμιο εισόδου στο χώρο ταχείας εξάτμισης, που βρίσκεται στην κεφαλή της στήλης. Για κοινές αναλυτικές στήλες απαιτείται δείγμα από λίγα δέκατα του μικρόλιτρου έως 20 μl, ενώ για τριχοειδείς πολύ μικρότερα δείγματα.

### **Φούρνος στήλης**

Οι στήλες ανοικτού σωλήνα (τριχοειδείς στήλες) διακρίνονται σε δύο βασικούς τύπους: τις στήλες ανοικτού σωλήνα με επικάλυψη τοιχωμάτων (WCOT) όπου το εσωτερικό τοίχωμα είναι επικαλυμμένο με λεπτό στρώμα στατικής φάσης και τις στήλες με επικάλυψη υλικού στήριξης (SCOT) όπου το εσωτερικό τοίχωμα είναι επικαλυμμένο με λεπτό υμένιο υλικού στήριξης, όπως είναι η γη διατόμων. Σε αυτές τις στήλες συγκρατείται πολλαπλάσια ποσότητα στατικής φάσης σε σχέση με τις WCOT.

Οι πληρωμένες (πακεταρισμένες) στήλες κατασκευάζονται από υάλινους σωλήνες, μεταλλικούς ή πλαστικούς με τυπικό μήκος 2 έως 3 m και εσωτερική διάμετρο 2 έως 4 mm. Αυτές οι στήλες πληρούνται πυκνά με ένα λεπτά και ομοιόμορφο κονιοποιημένο πληρωτικό υλικό (υλικό στήριξης), το οποίο είναι καλυμμένο με ένα λεπτό στρώμα στατικής φάσης.

Το υλικό στήριξης μιας πληρωμένης στήλης συγκρατεί τη στατική φάση κατά τρόπο που να εκτίθεται όσο το δυνατόν μεγαλύτερη επιφάνεια στην κινητή φάση. Το υλικό πρέπει να είναι ανθεκτικό σε υψηλές θερμοκρασίες και να διαβρέχεται με ομοιόμορφο τρόπο από την υγρή στατική φάση. Σήμερα το χρησιμοποιούμενο υλικό στήριξης παρασκευάζεται από γη διατόμων.

Στις επιθυμητές ιδιότητες της κινητής φάσης σε μία στήλη χρωματογραφίας αερίου-υγρού περιλαμβάνονται: χαμηλή πτητικότητα, χημική αδράνεια, χαρακτηριστικά διαλύτη ώστε να πετυχαίνονται ικανοποιητικοί διαχωρισμοί.

Για να είναι ο χρόνος παραμονής μιας ουσίας στη στήλη ικανοποιητικός θα πρέπει η ουσία να παρουσιάζει κάποιο βαθμό συμβατότητας (διαλυτότητα) με τη στατική φάση. Η πολικότητα αποδίδει το βαθμό επίδρασης ηλεκτρικού πεδίου στην άμεση περιοχή ενός μορίου και μέτρο της αποτελεί η διπολική ροπή του. Πολικές στατικές φάσεις περιέχουν δραστικές ομάδες όπως -OH, -CN, -CO-. Στατικές φάσεις αποτελούμενες από υδρογονάνθρακες και διακυλοσιλοξάνια είναι απολικές ενώ φάσεις πολυεστέρων ισχυρά πολικές. Στις πολικές διαχωριζόμενες ουσίες συμπεριλαμβάνονται αλκοόλες, οξέα και αμίνες ενώ οι κορεσμένοι υδρογονάνθρακες ανήκουν στις απολικές. Σε γενικές γραμμές η πολικότητα της στατικής φάσης πρέπει να ταιριάζει με αυτή των διαχωριζόμενων ουσιών. Όταν το ταίριασμα είναι ικανοποιητικό, η σειρά έκλουσης καθορίζεται πλέον από το σημείο βρασμού των ουσιών. (Skoog et.al., 2005)



## Συστήματα ανίχνευσης

Ο ιδανικός ανιχνευτής πρέπει να διαθέτει τα ακόλουθα χαρακτηριστικά:

Ικανοποιητική ευαισθησία, Σταθερότητα και αναπαραγωγιμότητα, Γραμμική απόκριση επεκτεινόμενη σε περιοχή αρκετών τάξεων μεγέθους, Περιοχή θερμοκρασιών λειτουργίας από τη θερμοκρασία δωματίου μέχρι τουλάχιστον τους 400 °C, Σύντομους χρόνους απόκρισης ανεξάρτητα από την ταχύτητα ροής, Εξαιρετική αξιοπιστία και ευκολία στη χρήση, Παρόμοια απόκριση προς όλες τις διαχωριζόμενες ουσίες, Να μην καταστρέφει το δείγμα.

Στην αέρια χρωματογραφία ιδιαίτερα διαδεδομένοι ανιχνευτές είναι οι:

*Ανιχνευτής ιοντισμού φλόγας (FID):* Η λειτουργία του βασίζεται στο ότι ο αριθμός των παραγόμενων ιόντων είναι χονδρικά ανάλογος προς τον αριθμό των ανηγμένων ατόμων άνθρακα στη φλόγα. Ο ανιχνευτής δεν ανταποκρίνεται σε μη καύσιμα αέρια όπως SO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O, NO<sub>x</sub>.

*Ανιχνευτές σύλληψης ηλεκτρονίων (ECD):* από τους ευρύτετα χρησιμοποιούμενους ανιχνευτές για περιβαλλοντικά δείγματα λόγω εκλεκτικότητας προς αλογονούχες ενώσεις, κινόνες, νιτροενώσεις, όπως φυτοφάρμακα και πολυχλωριωμένα διφαινύλια.

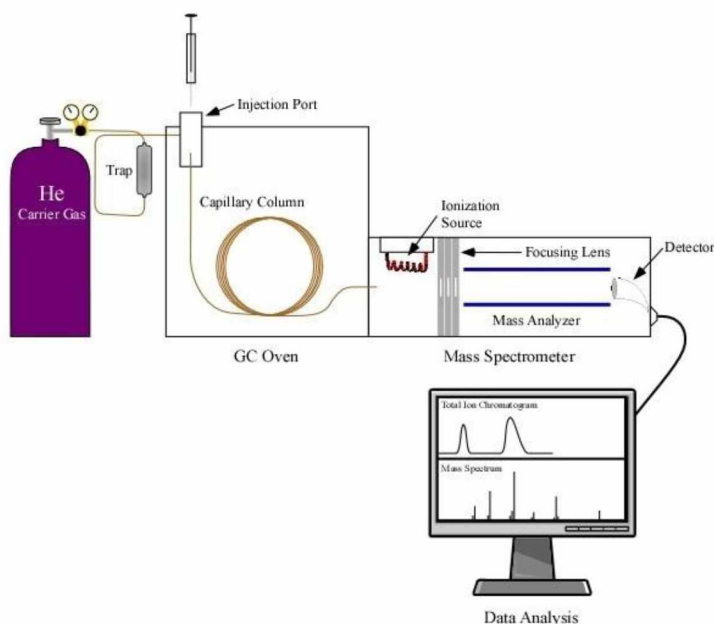
### 5.3.2. Εφαρμογές της χρωματογραφίας αερίου-υγρού

**Ποιοτική ανάλυση:** Τα αεριοχρωματογραφήματα χρησιμοποιούνται ευρύτετα ως κριτήρια καθαρότητας οργανικών ενώσεων. Εάν υπάρχουν μολύνσεις αυτές εμφανίζονται σαν επιπλέον κορυφές και τα εμβαδά των κορυφών αυτών χρησιμοποιούνται ως μέσα εκτίμησης της έκτασης της μόλυνσης.

**Ποσοτική ανάλυση:** Το σήμα από τον ανιχνευτή ενός αεριοχρωματογράφου έχει αξιοποιηθεί ευρύτετα για ποσοτικούς και ημιποσοτικούς προσδιορισμούς. Η φύση του δείγματος παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην ορθότητα των αποτελεσμάτων.

### 5.3.3. Διασύνδεση της αεροχρωματογραφίας με φασματοσκοπικές τεχνικές (GC/MS)

Αρκετοί κατασκευαστές οργάνων προσφέρουν αεριοχρωματογράφους που μπορούν να συζευχθούν άμεσα με φασματογράφους μαζών ταχείας σάρωσης. Η ταχύτητα ροής μέσω τριχοειδών στηλών είναι γενικά μικρή, οπότε το έκλουσμα μπορεί απ' ευθείας να εισάγεται στο θάλαμο ιοντισμού του φασματομέτρου μαζών.

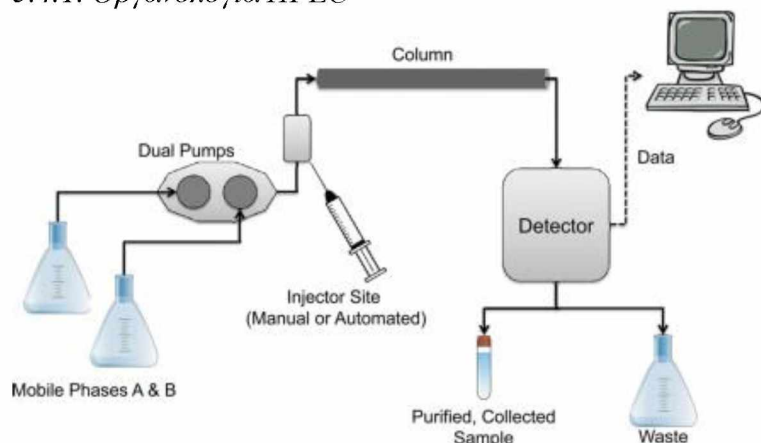


Εικόνα 5.3.: διάγραμμα αεριοχρωματογράφου τριχοειδούς στήλης συζευγμένου με φασματογράφο μαζών (GC/MS) πηγή: Moore analytical

#### 5.4. Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC)

Η τεχνική της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης αποτελεί εξέλιξη της κλασικής χρωματογραφίας ανοιχτής στήλης και η ανάπτυξή της οφείλεται στη βελτίωση της τεχνολογίας (χρήση H/Y, κατασκευή ανθεκτικών στηλών, χρήση νέων ανιχνευτών) και στις βελτιωμένες δυνατότητες που παρέχει έναντι των άλλων αναλυτικών μεθόδων. Η κλασική υγρή χρωματογραφία στήλης χρησιμοποιεί στήλες σχετικά μεγάλης διαμέτρου, πληρωμένες με μεγάλης διαμέτρου σωματίδια πληρωτικού υλικού και μικρές ταχύτητες ροής της κινητής φάσεως, που πετυχαίνονται λόγω βαρύτητας ή με τη χρησιμοποίηση αντλιών χαμηλής πίεσεως. Ως εκ τούτου, ο χρόνος που απαιτείται για ένα διαχωρισμό είναι συχνά της τάξεως των μερικών ωρών και τα συλλεγόμενα κλάσματα πρέπει συνήθως να αναλυθούν ξεχωριστά, αυξάνοντας σημαντικά το συνολικό χρόνο αναλύσεως (Χατζηιωάννου, Θ.Π & Κουμπάρης, Μ.Α, 1990). Αντίθετα στην HPLC χρησιμοποιούνται μοντέρνες αναλυτικές στήλες μικρότερης διαμέτρου που περιέχουν κόκκους μεγέθους 3-10  $\mu\text{m}$ . Έτσι, με την πυκνή συσκευασία της στήλης οδηγούμαστε σε μια υψηλή αντίσταση ροής, ώστε η κινητή υγρή φάση να περάσει με πίεση από την στήλη (Γεωργαράκης, Μ., 2009). Με την HPLC επιτυγχάνονται ταχύτεροι και καλύτερης απόδοσης διαχωρισμοί μιγμάτων, προσαρμόζεται εύκολα σε ακριβείς ποσοτικούς προσδιορισμούς, είναι κατάλληλη για διαχωρισμούς μη πτητικών ή θερμικά ευαίσθητων ουσιών. (Skoog et.al., 2005)

#### 5.4.1. Οργανολογία HPLC



Εικόνα 5.4.: σχηματική παράσταση μιας διάταξης HPLC (πηγή: sciencedirect)

#### **Δοχεία κινητής φάσης και συστήματα επεξεργασίας διαλυτών**

Τα δοχεία (υάλινα ή ανοξείδωτα) που περιέχουν τους διαλύτες της κινητής φάσης, είναι συχνά εφοδιασμένα με μέσα απομάκρυνσης των διαλυμένων αερίων, συνήθως οξυγόνου και αζώτου, έτσι ώστε να μην σχηματίζονται φυσαλίδες στη στήλη και στον ανιχνευτή των συστημάτων και έχουμε διεύρυνση των κορυφών.

Ο διαχωρισμός στον οποίο χρησιμοποιείται ένας διαλύτης σταθερής σύστασης καλείται ισοκρατική έκλουση. Συχνά η απόδοση του διαχωρισμού ενισχύεται σημαντικά με τη βαθμιδωτή έκλουση. Εδώ χρησιμοποιούνται δύο ή τρία συστήματα διαλυτών, που διαφέρουν σημαντικά ως προς την πολικότητα. Αφού αρχίσει η έκλουση, ο λόγος των διαλυτών μεταβάλλεται με τρόπο προγραμματισμένο άλλες φορές συνεχώς και άλλες με μία σειρά βημάτων. Τα σύγχρονα συστήματα HPLC είναι συχνά εφοδιασμένα με διατάξεις οι οποίες εισάγουν διαλύτες από δύο ή περισσότερα δοχεία σε θάλαμο ανάμιξης με ρυθμούς που μεταβάλλονται συνεχώς.

#### **Συστήματα άντλησης**

Συναντούμε τρεις τύπους αντλιών διαλύτη κινητής φάσης: παλινδρομικές, εκτόπισης, πνευματικές.

#### **Συστήματα έγχυσης δείγματος**

Ο τρόπος εισαγωγής του δείγματος στην στήλη αποτελεί τον περιοριστικό παράγοντα στην επαναληψιμότητα των μετρήσεων. Οι όγκοι πρέπει να είναι ελάχιστοι, απο μερικές δεκάδες μικρόλιτρα έως και 500  $\mu\text{L}$

Η συνηθέστερα χρησιμοποιούμενη μέθοδος εισαγωγής δείγματος βασίζεται σε βρόγχους δειγμάτων και έτσι εισάγονται δείγματα σε πιέσεις μέχρι 7000 psi με επαναληψιμότητα μερικών δεκάτων %. Επίσης είναι διαθέσιμες βαλβίδες έγχυσης για μικροογκούς με βρόχους δείγματος από 0.5 έως 5  $\mu\text{L}$ .

#### **Στήλες υγροχρωματογραφίας**

Συνήθως έχουν μήκος από 10 έως 30cm και είναι ευθύγραμμες. Η εσωτερική διάμετρος είναι συνήθως 4 έως 10 mm και το μέγεθος σωματιδίων του υλικού πλήρωσης είναι 5 ή 10  $\mu\text{m}$ . Συνήθως πριν από την αναλυτική στήλη, παρεμβάλλεται μια μικρή προστατευτική στήλη ή

προ-στήλη, για να αυξήσει τον χρόνο ζωής της, απομακρύνοντας όχι μόνο τα αιωρούμενα σωματίδια και τις προσμίξεις από τον διαλύτη αλλά και τα συστατικά του δείγματος που συνδέονται με την στατική φάση μη αντιστρεπτά. Καλύτερα αποτελέσματα λαμβάνονται όταν η θερμοκρασία της στήλης διατηρείται σταθερή εντός μερικών δεκάτων του βαθμού Κελσίου. Τα σύγχρονα όργανα σήμερα είναι εφοδιασμένα με θερμοστάτες που ελέγχουν τη θερμοκρασία της στήλης σε περιοχή δωματίου μέχρι 100 ή 150° με ακρίβεια μερικών δεκάτων του βαθμού.

Δύο τύποι πληρωτικών υλικών χρησιμοποιούνται στην υργοχρωματογραφία, ο πρώτος τύπος αποτελείται από σφαιροειδή σωματίδια και ο δεύτερος από πορώδη. Τα πρώτα είναι σφαιρικά, μη πορώδη σωματίδια από ύαλο ή πολυμερές. Στην επιφάνειά τους αποτίθεται λεπτό πορώδες στρώμα όπως διοξείδιο του πυριτίου, αλουμίνα ή ρητίνη. Τα πορώδη σωματίδια είναι μικροσωματίδια διαμέτρου 3-10 μm. Το διοξείδιο του πυριτίου (SiO<sub>2</sub>) είναι το συνηθέστερο υλικό πλήρωσης.

#### **Ανιχνευτές**

Οι ανιχνευτές που χρησιμοποιούνται μπορεί να είναι απορρόφησης, φθορισμού, δείκτη διάθλασης, σκέδασης φωτός μετά από εξάτμιση, ηλεκτροχημικοί ανιχνευτές και φασματομετρίας μαζών.(Skoog et.al., 2005)

#### **5.4.2. Είδη HPLC**

Οι τέσσερις βασικοί τύποι χρωματογραφίας HPLC είναι κατανομής, προσρόφησης, ιοντοανταλλαγής και μοριακού αποκλεισμού ή πηκτής.

##### **Χρωματογραφία κατανομής**

Είναι ο περισσότερο χρησιμοποιούμενος τύπος και μπορεί να είναι υγρού-υγρού και συνδεδεμένης φάσης, ανάλογα με τον τρόπο με τον οποίο η στατική φάση κατακρατείται στα σωματίδια του υλικού στήριξης. Στην υγρού-υγρού, η υγρή στατική φάση κατακρατείται στην επιφάνεια του υλικού πλήρωσης με φυσική προσρόφηση και στην συνδεδεμένης φάσης, η στατική δεσμεύεται χημικά στην επιφάνεια του υλικού στήριξης.

Η χρωματογραφία κανονικής φάσης αναφέρεται στην χρωματογραφία κατανομής όπου η στατική φάση είναι υψηλής πολικότητας (όπως ύδωρ ή τριαιθυλενογλυκόλη), κατακρατούμενες σε σωματίδια πυριτίας ή αλουμίνας, ενώ σαν κινητή φάση χρησιμοποιείται ένας σχετικά μη πολικός διαλύτης, όπως εξάνιο ή ισοπροπυλαιθέρας. Οπότε, το λιγότερο πολικό συστατικό εκλύεται πρώτο, αφού είναι περισσότερο διαλυτό στην κινητή φάση.

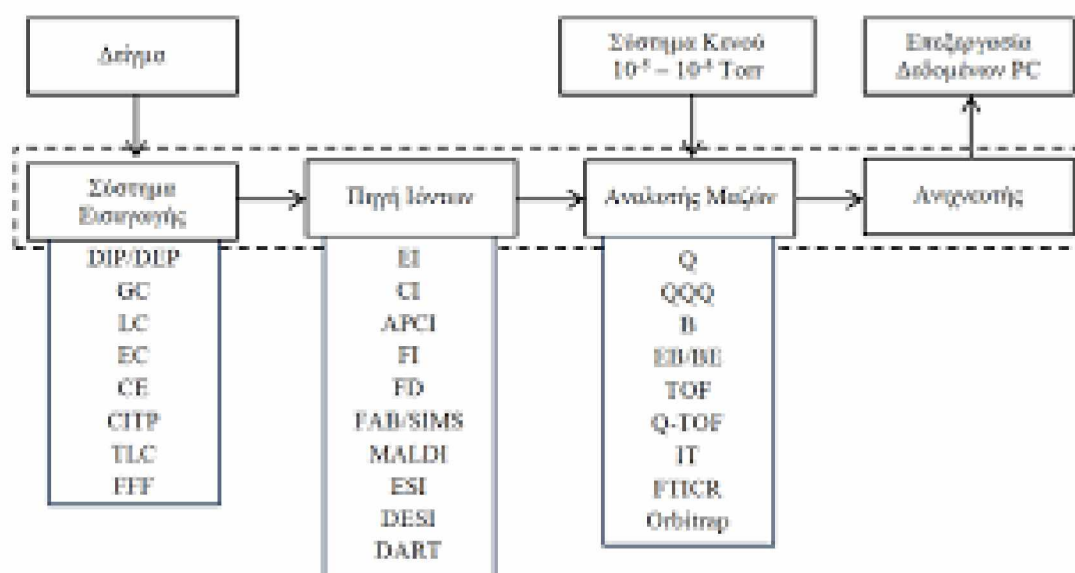
Στην χρωματογραφία αντίστροφης φάσης, η στατική φάση είναι μη πολική, συχνά ένας υδρογονάνθρακας και η κινητή φάση ένας σχετικά πολικός διαλύτης (όπως ύδωρ, μεθανόλη ή ακετονιτρίλιο). Σε αυτή την περίπτωση το το πολικότερο συστατικό εμφανίζεται πρώτο και με αύξηση της πολικότητας της κινητής φάσης ο χρόνος έκλουσης αυξάνει.

Η χρωματογραφία κατανομής βρίσκει εφαρμογή στην ταυτοποίηση διαφόρων ενώσεων διαφόρων πεδίων όπως σε φάρμακα, ρυπαντές, προϊόντα τροφίμων, βιομηχανικά χημικά και βιοχημικά.

#### **5.5. Φασματομετρία μοριακών μαζών**

Φασματομετρία μάζας καλείται η τεχνική κατά την οποία τα συστατικά ενός δείγματος μετατρέπονται σε ταχύτατα κινούμενα ιόντα και διαχωρίζονται σε σχέση με το λόγο της μάζας προς το φορτίο τους ( $m/z$ ). Η αρχή της τεχνικής βασίζεται στην παρατήρηση ότι τα θετικά ιόντα αποκλίνουν της φοράς τους κατά την κίνηση τους σε ηλεκτρικά ή μαγνητικά πεδία. Η φασματομετρία μάζας προσφέρει πληροφορίες για την ποιοτική και ποσοτική σύσταση αγνώστων μιγμάτων ανόργανων και οργανικών ενώσεων, τη χημική δομή πολύ μεγάλου αριθμού ενώσεων, την παρουσία και το ποσοστό ισοτόπων και τη δομή και σύσταση στερεών επιφανειών. Η φασματομετρία μάζας μπορεί να συνδυασθεί με την αέρια χρωματογραφία (GC) ή την υγρή χρωματογραφία (LC) και παρέχει στον αναλυτή τις ονομαζόμενες συζευγμένες τεχνικές GCMS/MS ή LC-MS/MS, η συμβολή των οποίων τόσο στην έρευνα όσο και σε εφαρμογές ρουτίνας θεωρείται ανεκτίμητη.

### 5.5.1. Φασματομέτρα μαζών



Εικόνα 6.1.: διάγραμμα ενός φασματομέτρου μαζών

Ένας τυπικός φασματογράφος μαζών αποτελείται, από τα εξής επιμέρους τμήματα:

- 1) Το σύστημα της εισαγωγής του δείγματος. Τις περισσότερες φορές το δείγμα εισάγεται στην αέρια ή την υγρή μορφή.
- 2) Την πηγή ιόντων, όπου τα εισερχόμενα συστατικά μετατρέπονται σε ιόντα. Συχνά το σύστημα εισαγωγής συνενώνεται με την πηγή ιόντων.
- 3) Τον αναλυτή μαζών. Εδώ λαμβάνει χώρα ο διαχωρισμός των ιόντων ανάλογα με το  $m/z$  τους.
- 4) Τον ανιχνευτή που συλλαμβάνει τα διαχωριζόμενα ιόντα και τα μετατρέπει σε ηλεκτρικό σήμα.
- 5) Το σύστημα κενού. Ο φασματογράφος βρίσκεται υπό κενό το οποίο δημιουργείται από εσωτερικές και εξωτερικές αντλίες κενού.
- 6) Τον ηλεκτρονικό υπολογιστή με κατάλληλο λογισμικό. (Skoog et.al., 2005)



### 5.5.2. Σύστημα εισαγωγής του δείγματος

Σκοπός της διάταξης είναι η εισαγωγή του δείγματος με ελάχιστη απώλεια κενού. Υπάρχουν διαφορετικά συστήματα για την εισαγωγή αερίων, υγρών ή στερεών δειγμάτων. Το κλασικότερο σύστημα εισαγωγής είναι αυτό της μεμονωμένης εισαγωγής όπου το δείγμα εξαερώνεται σε έναν εξωτερικό χώρο αποθήκευσης και στη συνέχεια αφήνεται να διαρρέυσει προς τη κενή περιοχή ιοντισμού. Για την εισαγωγή στερεών ή μη πτητικών υγρών χρησιμοποιείται ειδικό σύστημα εισαγωγής δείγματος με ακροφύσιο (Probe), το οποίο εισέρχεται στην πηγή ιόντων. Το ακροφύσιο συχνά είναι ένα μεταλλικός ή υάλινος σωλήνας, ο οποίος, συνήθως, καταλήγει σε μικροδοχείο όπου και βρίσκεται το προς ανάλυση δείγμα. Στην περίπτωση όπου η φασματομετρία μάζας είναι σε σύζευξη με χρωματογραφικό σύστημα, η εισαγωγή δείγματος γίνεται μέσω μιας διάταξης σύζευξης. Στην αέρια χρωματογραφία πρακτικά η εισαγωγή των μορίων προς ανάλυση γίνεται μέσω ενός θερμαινόμενου σωλήνα (interface) που ενώνει την άκρη της στήλης με την πηγή ιόντων. Στις χρωματογραφικές τεχνικές υγρής φάσης, όπως HPLC, χρησιμοποιούνται ειδικές διατάξεις σύζευξης.

### 5.5.3. Πηγές ιόντων

Στον παρακάτω πίνακα δίνονται οι κύριες τεχνικές ιοντισμού που εφαρμόζονται, οι διατάξεις με τις οποίες συνδυάζονται, τα είδη των ιόντων που παράγονται καθώς και οι κατηγορίες των αναλυόμενων ενώσεων που ενδείκνυνται.

Τεχνική Ιοντισμού	Κύρια Ιόντα	Αναλυτής Μάζων	Τάξεις ενώσεων
Ιοντισμός ηλεκτρονίων	$M^+$ , θυγατρικά ιόντα	Q, TOF, IT, B	Μη πολικές, κάποιες πολικές <500 datlon
MALDI	$[M+H]^+$ $[M-H]^-$	TOF, Orbitrap	Πολικές, κάποιες μη πολικές, βιοπολυμερή, συνθετικά πολυμερή Εως $10^6$ datlon
Electrospray (DESI, EESI)	$[M+H]^+$ $[M-H]^-$ ιόντα προσθήκης π.χ. $[M+NH_4]^+$	Q, TOF, IT, FTICR, Orbitrap	Πολικές, κάποιες μη πολικές οργανικές, πρωτεΐνες <200.000 datlon
APCI	$[M+H]^+$ $[M-H]^-$	Q, TOF, IT	Μη πολικές, κάποιες πολικές <1000 datlon

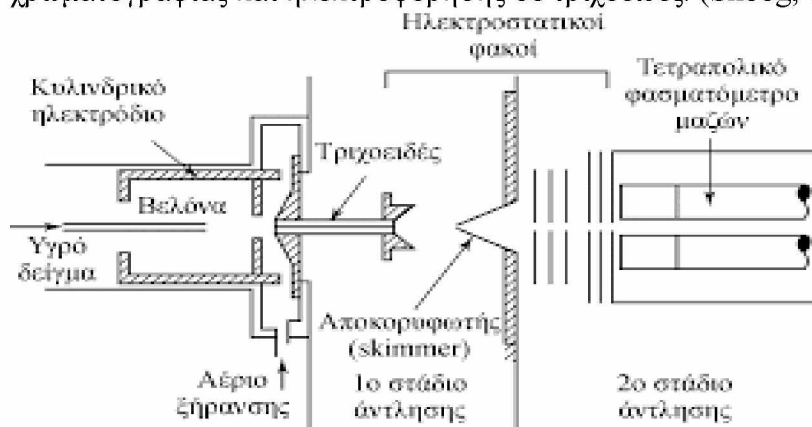
Εικόνα 6.2.: κύριες τεχνικές ιοντισμού

Η επιλογή της τεχνικής ιοντισμού που θα εφαρμοστεί είναι μεγάλης σημασίας για την ανάλυση που θα ακολουθήσει. Για την ίδια ένωση, το λαμβανόμενο φάσμα μπορεί να είναι εντελώς διαφορετικό με εφαρμογή διαφορετικών τεχνικών και συνθηκών ιοντισμού. Ένας διαχωρισμός των τεχνικών ιοντισμού μπορεί να γίνει σε "μαλακές" και "σκληρές" τεχνικές. Στις σκληρές τεχνικές ιοντισμού μεταδίδεται στα μόρια του αναλύτη αρκετή ενέργεια, ώστε να παραμείνουν σε έντονα διεγερμένη ενεργειακή κατάσταση. Στη συνέχεια η αποδιέγερση περιλαμβάνει επιπλέον σπάσιμο δεσμών και παραγωγή ιοντικών θραυσμάτων με λογους  $m/z$  μικρότερους από του μοριακού ιόντος. Οι μαλακές πηγές προκαλούν περιορισμένη θραύση, οπότε το λαμβανόμενο φάσμα μαζών συχνά αποτελείται από την κορυφή του μοριακού ιόντος και λίγες μόνο επιπλέον κορυφές.

Τα φάσματα τόσο μιας σκληρής όσο και μιας μαλακής πηγής είναι χρήσιμα στην ανάλυση. Οι πολλές κορυφές σε ένα φάσμα σκληρής πηγής παρέχουν χρήσιμες πληροφορίες για τα είδη των δραστικών ομάδων και επομένως για τη δομή των αναλυτών. Τα φάσματα μαλακών πηγών είναι χρήσιμα επειδή παρέχουν ακριβείς πληροφορίες ως προς το μοριακό βάρος των μορίων του αναλύτη. Παρακάτω περιγράφεται ο ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό, ο οποίος χρησιμοποιείται στην παρούσα εργασία.

### Ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό

Η φασματομετρία μαζών με ιοντισμό με ηλεκτροψεκασμό (electrospray ionization/mass spectrometry, ESI/MS) περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1984 και σήμερα αποτελεί μια από τις σημαντικότερες τεχνικές για μετρήσεις βιομορίων, όπως πολυπεπτίδια, πρωτεΐνες και ολιγονουκλεοτίδια με μοριακά βάρη  $\geq 100.000$  Da. Επιπλέον, η τεχνική αυτή έχει αρχίσει να βρίσκει εφαρμογές στον χαρακτηρισμό ανόργανων ουσιών και συνθετικών πολυμερών. Ο ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό πραγματοποιείται σε ατμοσφαιρική πίεση και θερμοκρασία. Το διάλυμα του δείγματος αντλείται μέσω μιας ανοξείδωτης τριχοειδούς βελόνας με ταχύτητα μερικών  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Η βελόνα βρίσκεται σε δυναμικό αρκετών kV ως προς ένα κυλινδρικό ηλεκτρόδιο που περιβάλλει τη βελόνα. Οι δημιουργούμενες φορτισμένες μικρές σταγόνες διέρχονται μέσω ενός τριχοειδούς, όπου ο διαλύτης εξατμίζεται και φορτίζονται τα μόρια του αναλύτη. Καθώς οι σταγόνες μικραίνουν λόγω της εξαέρωσης του διαλύτη, η πυκνότητα φορτίου αυξάνει και πραγματοποιείται εκρόφηση των ιόντων στο περιβάλλον αέριο. Ενδιαφέρον και χρήσιμο χαρακτηριστικό της διαδικασίας ηλεκτροψεκασμού είναι ότι η θραύση μεγάλων και θερμικά ευπαθών βιομορίων είναι περιορισμένη. Επιπλέον τα παραγόμενα ιόντα είναι πολυσθενή, οπότε οι τιμές  $m/z$  είναι αρκετά μικρές και ανιχνεύονται εύκολα με τετραπολικά όργανα, που καλύπτουν περιοχή μοριακών βαρών 1500 ή μικρότερη. Ένα επιπλέον χαρακτηριστικό του ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό είναι ότι εύκολα προσαρμόζεται σε συστήματα άμεσης εισαγωγής δείγματος από στήλες υγρής χρωματογραφίας και ηλεκτροφόρησης σε τριχοειδείς. (Skoog, et al., 2005).



Εικόνα 6.3.: Συσκευή για ιοντισμό με ηλεκτροψεκασμό. (πηγή: J.B. Fenn et al., Science, 1989, 246, 65 από Skoog et.al., 2005)

#### 5.5.4. Αναλύτης Μαζών

Για τον διαχωρισμό ιόντων με διαφορετικούς λόγους  $m/z$  διατίθενται διάφορες διατάξεις. Ο ιδανικός αναλυτής μαζών πρέπει να διαχωρίζει μάζες που διαφέρουν ελάχιστα μεταξύ τους και να επιτρέπει τη διέλευση αρκετών ιόντων ώστε να παραχθεί ένα άμεσα μετρήσιμο ρεύμα ιόντων.

Η ικανότητα ενός φασματομέτρου μαζών να διαχωρίζει μάζες ορίζεται ως διακριτική ικανότητα  $R$  :

$$R = m/\Delta m$$

όπου:  $\Delta m$  η διαφορά μαζών δύο διαδοχικών κορυφών και  $m$  η μάζα της πρώτης κορυφής.

Δύο κορυφές θεωρείται ότι διαχωρίζονται όταν η επικάλυψή τους δεν υπερβαίνει ένα δεδομένο κλάσμα του ύψους τους (συνήθως 10% )

Οι αναλυτές μαζών μπορεί να είναι:

1. αναλυτές μαγνητικού τομέα (magnetic sector), όπου διαθέτουν έναν μόνιμο μαγνήτη ή ένα ηλεκτρομαγνητικό το πεδίο των οποίων αναγκάζει τα ιόντα να κινηθούν σε μία κυκλική τροχιά. Μεταβάλλοντας την ένταση του πεδίου του μαγνήτη σαρώνονται ιόντα διαφορετικών μαζών στην σχισμή εξόδου του αναλυτή όπου και καταγράφεται το ηλεκτρικό ρεύμα αφού πρώτα ενισχυθεί.

2. τετραπολικά φασματομέτρα μαζών (ή τετράπολα), όπου προσφέρουν το πλεονέκτημα μικρών χρόνων σάρωσης. Καρδιά του τετραπολικού φασματομέτρου είναι οι τέσσερις παράλληλες διαγώνιες ράβδοι οι οποίες δρουν ως ηλεκτρόδια. Οι ράβδοι συνδέονται ηλεκτρικά μεταξύ τους. Το ένα ζεύγος συνδέεται με τον θετικό πόλο μιας πηγής μεταβλητής τάσης DC, ενώ το άλλο με τον αρνητικό πόλο της πηγής. Επιπλέον σε κάθε ζεύγος εφαρμόζεται μεταβλητή τάση AC που μεταξύ τους βρίσκονται σε διαφορά φάσης  $180^\circ$ . Για να ληφθεί το φάσμα μαζών, τα ιόντα επιταχύνονται στο χώρο ανάμεσα στις ράβδους με ένα δυναμικό 5-10V. Τα εναλλασσόμενα και συνεχή δυναμικά των ράβδων αυξάνουν συγχρόνως διστηρώντας όμως τον λόγο τους σταθερό. Σε κάποια χρονική στιγμή όλα τα ιόντα, εκτός από αυτά που έχουν μία συγκεκριμένη τιμή λόγου  $m/z$ , φθάνουν στις ράβδους και μετατρέπονται σε ουδέτερα μόρια. Έτσι φθάνουν στον μεταλλάκτη μόνο ιόντα όπου οι τιμές  $m/z$  βρίσκονται σε μία στενή περιοχή τιμών  $m/z$ .

3. αναλυτές "παγίδας ιόντων" (ion trap), όπου δημιουργούνται ανιόντα ή κατιόντα σε αέρια κατάσταση και περιορίζονται για αρκετό διάστημα με ένα ηλεκτρικό ή και μαγνητικό πεδίο.

4. αναλυτές μαζών "χρόνου πτήσης" (Time of Flight, TOF), όπου παράγονται κατά περιοδικό τρόπο θετικά ιόντα με βομβαρδισμό του δείγματος με σύντομους παλμούς ηλεκτρονίων, δευτερογενών ιόντων ή φωτονίων από λέιζερ. Ο διαχωρισμός των ιόντων ανάλογα με την μάζα πραγματοποιείται κατά την πτήση των ιόντων προς τον ανιχνευτή που βρίσκεται στο τέλος του σωλήνα. Επειδή όλα τα ιόντα έχουν την ίδια κινητική ενέργεια, οι ταχύτητές τους κατά τη διαδρομή στο φτάνουν γρηγορότερα στον ανιχνευτή. (Skoog et.al., 2005).

5. αναλυτής τροχιακής παγίδας ιόντων (Orbitrap).

Οι αναλυτές TOF και Orbitrap θεωρούνται ως αναλυτές υψηλής διακριτικής ικανότητας (high-resolution) και είναι ιδιαίτερα χρήσιμοι στην μη στοχευμένη χημική ανάλυση.

## 5.6. Χρωματογραφία/φασματομετρία μαζών

Η φασματομετρία μαζών έχει συζευχθεί με αέρια και υγρή χρωματογραφία και έτσι έχει γίνει από τα πιο χρήσιμα εργαλεία σήμερα για την ανάλυση πολύπλοκων οργανικών και βιοχημικών μιγμάτων και την ανάλυση μη πτητικών συστατικών.

#### **GC/MS**

Τα περισσότερα φασματόμετρα μαζών τετραπόλου ή μαγνητικού τομέα προσφέρονται με τα απαραίτητα εξαρτήματα για τη σύνδεσή τους με αεριοχρωματογραφικές μονάδες.

Οι ανιχνευτές φασματομετρίας μαζών διαθέτουν αρκετούς τρόπους παρουσίασης των αποτελεσμάτων και μπορεί να είναι παρουσίαση σε πραγματικό χρόνο ή παρουσίαση με ανασύνθεση μέσω υπολογιστή. Σε πραγματικό χρόνο τα φάσματα μαζών εμφανίζονται σε οθόμη παλμογράφου εφοδιασμένη με δείκτες μαζών ενώ στην παρουσίαση με ανασύνθεση, μετά την ολοκλήρωση του διαχωρισμού τα χρωματογραφήματα που ανασύντιθενται μέσω υπολογιστή μπορούν να παρουσιαστούν στην οθόνη ή να εκτυπωθούν.

#### **LC/MS**

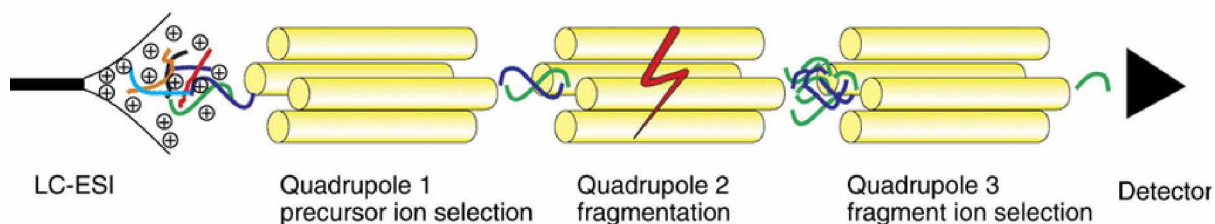
Το βασικό πρόβλημα στη σύζευξη υγροχρωματογραφίας με τη φασματομετρία μαζών είναι η ασυμβατότητα μεταξύ των σχετικά μεγάλων όγκων διαλυτών που χρησιμοποιούνται στην πρώτη και του κενού που απαιτείται στη δεύτερη. Έτσι έχουν προταθεί διάφορα σχήματα διασύνδεσης. Σε ένα εμπορικά διαθέσιμο σύστημα το υγρό έκλουσης από τη στήλη διαχωρίζεται και μόνο ένα μικρό κλάσμα εισάγεται κατευθείαν στον ανιχνευτή μαζών.

Ένας νέος τρόπος διασύνδεσης είναι ο θερμοψεκασμός. Η διασύνδεση αυτή επιτρέπει την κατευθείαν εισαγωγή όλου του υγρού έκλουσης από την στήλη με ταχύτητες ροής έως και 2 ml/min. Στη διασύνδεση αυτή το υγρό ατμοποιείται καθώς διέρχεται μέσα από ένα ανοεξιδωτο θερμαινόμενο τριχοειδή σωλήνα σχηματίζοντας νέφος σωματιδίων αποτελούμενα από τον διαλυτή και μόρια του μετρούμενου συστατικού. Στο σχηματιζόμενο νέφος το συστατικό ιοντίζεται μέσω ενός μηχανισμού ανταλλαγής φορτίου με ένα άλας, όπως το οξικό αμμώνιο, που προστίθεται στον διαλύτη έκλουσης.

Πρόσφατα διατίθεται στο έμποριο και ακόμα ένας τρόπος διασύνδεσης ου καθιστά εφικτή τη απόκτηση φασμάτων ιοντισμού με πρόσκρουση ηλεκτρονίων ή με χημικό ιοντισμό. Στη διάταξη αυτή πραγματοποιείται ταυτόχρονα θερμική εκνέφωση και απομάκρυνση του διαλύτη για την παραγωγή ενός μίγματος μορίων συστατικών και διαλύτη στην αέρια φάση. Το νέφος των σωματιδίων επιταχύνεται με ένα ακροφύσιο στην περιοχή του κενού, όπου απομακρύνονται με άντληση τα μόρια της κινητής φάσης. Εδώ ο διαχωρισμός επιτυγχάνεται με τη βοήθεια διαχωριστη ορμής και τα μόρια του αναλυόμενου συστατικού ιοντίζονται στη συνέχεια με δέσμη ηλεκτρονίων ή με χημικό τρόπο. (R.C. Willoughby and R.F. Browner, 1984)

### **5.7. Τεχνική Φασματομετρίας Μαζών σε σειρά (MS/MS)**

Η φασματομετρία μάζας σε σειρά είναι η συχνότερα χρησιμοποιούμενη σε σχέση με όλες τις υπόλοιπες τεχνικές φασματομετρίας μάζας, και αφορά τη σύζευξη ενός φασματόμετρου μάζας με ένα δεύτερο. Στην τεχνική αυτή το πρώτο φασματόμετρο χρησιμοποιείται για την απομόνωση των μοριακών ιόντων των διαφόρων συστατικών ενός μίγματος. Στη συνέχεια, τα ιόντα εισάγονται σε ένα δεύτερο φασματόμετρο μαζών, όπου θραύονται για να δώσουν μία σειρά φασμάτων μαζών, ένα για κάθε μοριακό ιόν που παράγεται από το πρώτο φασματόμετρο.



Εικόνα 6.4. : διάγραμμα συζευγμένου τετραπολικού οργάνου MS/MS (πηγή research gate.com)

Σήμερα τα περισσότερα συζευγμένα φασματομέτρα μαζών έχουν την παραπάνω διάταξη, QQQ. Το δείγμα εισάγεται σε μία πηγή ιοντισμού μικρής έντασης. Στη συνέχεια τα ιόντα επιταχύνονται και οδηγούνται στο πρώτο στάδιο ανάλυσης ή στον διαχωριστή μητρικού ιόντος, που είναι ένα τετραπολικό φίλτρο. Τα διαχωρισμένα ιόντα με μεγάλες πλέον ταχύτητες οδηγούνται στο τετράπολο 2 το οποίο είναι ένας θάλαμος προσκρούσεων όπου συμβαίνει περαιτέρω ιοντισμός των μητρικών ιόντων που παράγονται στο τετράπολο 1. Αυτό το τετράπολο λειτουργεί μόνο με ραδιοσυχνότητες, δηλαδή δεν εφαρμόζεται συνεχές δυναμικό μεταξύ των ράβδων. Αυτός ο τρόπος λειτουργίας παρέχει έναν αποτελεσματικό τρόπο εστίασης των σκεδαζόμενων ιόντων αλλά δεν λειτουργεί ως φίλτρο μαζών. Στον θάλαμο αυτόν εισάγεται ήλιο, ώστε η πίεση να είναι από  $10^{-3}$  έως  $10^{-4}$  torr. Εδώ συνεχίζεται ο ιοντισμός ως αποτέλεσμα των προσκρούσεων των μητρικών ιόντων μεγάλων ταχυτήτων και των ατόμων ηλίου. Τα παραγόμενα θυγατρικά ιόντα εισέρχονται στο τετράπολο 3, όπου σαρώνονται και καταγράφονται με τον συνηθισμένο τρόπο. (Skoog et al., 2005)

## 6. Επιλογή αναλυτικής μεθόδου

Τα ποσοτικά κριτήρια απόδοσης, τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν προκειμένου να αποφασισθεί, εάν μία ενόργανη μέθοδος είναι κατάλληλη για την αντιμετώπιση ενός αναλυτικού προβλήματος, εκφράζονται σε αριθμητικές τιμές, ονομάζονται μέτρα αξιολόγησης και είναι τα παρακάτω

### 6.1. Μέση τιμή δείγματος

Η μέση τιμή δείγματος (sample mean) είναι η μέση τιμή (ή μέσος όρος) ενός δεδομένου αριθμού μετρήσεων. Επειδή το  $N$  είναι ένα πεπερασμένος αριθμός, η συχνά διαφέρει κάπως από τη μέση τιμή του πληθυσμού  $\mu$ , δηλαδή της αληθούς τιμής της μετρούμενης ποσότητας (Skoog et al., 2005). Η μέση τιμή δίνεται από την εξίσωση

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^N x_i}{N}$$

### 6.2. Τυπική απόκλιση (s) και μεταβλητότητα ( $s^2$ ) δείγματος

Η τυπική απόκλιση (s) των δεδομένων ενός δείγματος περιορισμένου μεγέθους δίνεται από την εξίσωση



$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}{N-1}}$$

### 6.3. Σχετική τυπική απόκλιση και συντελεστής μεταβλητότητας

Η σχετική τυπική απόκλιση (relative standard deviation, RSD) παρέχει συχνά καλύτερη πληροφόρηση σε σχέση με την απόλυτη τυπική απόκλιση. Η σχετική τυπική απόκλιση ενός δείγματος αναλυτικών δεδομένων δίνεται από τη σχέση

$$RSD = \frac{s}{\bar{x}} \times 10^z$$

Όταν η σχετική τυπική απόκλιση εκφράζεται επί τοις εκατό (%) αναφέρεται και ως συντελεστής μεταβλητότητας (coefficient of variation, CV) των δεδομένων. Δηλαδή

$$CV = \frac{s}{\bar{x}} \times 100\%$$

### 6.4. Απόλυτο και σχετικό σφάλμα

Η **ακρίβεια** περιγράφει την ορθότητα του πειραματικού αποτελέσματος. Αυστηρώς οριζόμενη, το μόνο είδος μέτρησης που μπορεί να είναι απόλυτα ακριβές είναι αυτό που περιλαμβάνει απαριθμούμενα αντικείμενα. Όλες οι υπόλοιπες μετρήσεις περιλαμβάνουν σφάλματα και δίνουν μόνο μια προσέγγιση της αλήθειας. Η ακρίβεια εκφράζεται είτε ως το απόλυτο ή ως σχετικό σφάλμα. Το απόλυτο σφάλμα  $E_a$  της μέσης τιμής (ή του μέσου όρου) ενός μικρού αριθμού επαναλαμβανόμενων αναλύσεων δίνεται από τη σχέση:

$$E_a = \bar{x} - x_t$$

Συχνά, είναι χρήσιμο να εκφράζεται η ακρίβεια με την έννοια του σχετικού σφάλματος (relative error), όπου

$$\text{σχετικό σφάλμα} = \frac{\bar{x} - x_t}{x_t} \times 100\%$$

Με  $x_t$  μία αποδεκτή τιμή της ποσότητας που μετρείται.

Το σφάλμα  $E_a$  είναι άθροισμα δύο ειδών σφαλμάτων:

$$E_a = E_r + E_s$$

Όπου  $E_r$  είναι το τυχαίο σφάλμα της μέτρησης και  $E_s$  είναι το συστηματικό σφάλμα

Η ύπαρξη **τυχαίων σφαλμάτων** αντανακλάται στην έλλειψη επαναληψιμότητας των αποτελεσμάτων

Τα τυχαία σφάλματα συνοδεύουν κάθε μέτρηση, προέρχονται από μη μόνιμες αιτίες (ατέλειες των αισθητήριων οργάνων του παρατηρητή, παρασιτικές διαταραχές που παρενοχλούν τη μέτρηση, διακυμάνσεις εξωτερικών επιδράσεων και πλήθος άλλων αστάθμητων και μη ελεγχόμενων παραγόντων) και είναι δικατευθυνόμενα (θετικά και αρνητικά), γι' αυτό και επιδρούν ακανόνιστα στο αποτέλεσμα. Τα τυχαία σφάλματα έχουν ως μέση τιμή το μηδέν και εξουδετερώνονται με αύξηση του αριθμού των μετρήσεων, χωρίς όμως να είναι δυνατή η πλήρης εξάλειψή τους, εφόσον γι' αυτό θα χρειαζόταν άπειρες μετρήσεις. Στις χημικές αναλύσεις, τα αποτελέσματα των επαναλαμβανόμενων μετρήσεων που προκύπτουν από την ύπαρξη τυχαίων σφαλμάτων, θεωρούνται ότι κατανέμονται σύμφωνα με το νόμο της κανονικής κατανομής σφάλματος (Χατζηιωάννου Θ. et al, 2006)

Το τυχαίο σφάλμα  $E_r$  της μέσης τιμής ενός μικρού αριθμού δεδομένων δίνεται απλο τη σχέση:

$$E_r = \bar{x} - \mu$$

Τα **συστηματικά σφάλματα** έχουν καθορισμένη τιμή, προσδιορίσιμη αιτία και είναι ίδιου προσίμου και μεγέθους για επαναλαμβανόμενες μετρήσεις που πραγματοποιούνται με ακριβώς τον ίδιο τρόπο. Τα συστηματικά σφάλματα προσδίδουν σε μία τεχνική μέτρησης **στατιστική μεροληψία (bias)**.

$$\text{μεροληψία} = \mu - \chi_t$$

Με  $\mu$  την μέση τιμή του πληθυσμού για τη συγκέντρωση ενός αναλύτη σε ένα δείγμα με πραγματική συγκέντρωση  $\chi_t$ . Κανονικά κατά την ανάπτυξη μιας αναλυτικής μεθόδου γίνεται κάθε προσπάθεια για να εντοπισθεί η πηγή μεροληψίας και στη συνέχεια να εξουδετερωθεί ή να διορθωθεί με τη χρήση τυφλών (blanks) και με βαθμονόμηση του οργάνου.

Τα συστηματικά σφάλματα είναι τριών ειδών:

**Οργανολογικά:** Μεταξύ των τυπικών αιτιών των οργανολογικών σφαλμάτων αναφέρονται τα φαινόμενα ολίσθησης των ηλεκτρονικών κυκλωμάτων, οι διαρροές συστημάτων κενού, οι επιδράσεις θερμοκρασίας στους ανιχνευτές, τα επαγόμενα ρεύματα στα κυκλώματα από το δίκτυο παροχής τάσης, οι μειώσεις στις τάσεις των μπαταριών κατά τη χρήση τους και τα σφάλματα βαθμονόμησης σε μέτρα, σταθμά και ογκομετρικά σκεύη. Τα συστηματικά οργανολογικά σφάλματα συχνά ανακαλύπτονται και διορθώνονται με βαθμονόμηση με κατάλληλα πρότυπα. Η συχνή βαθμονόμηση των συσκευών είναι πάντοτε επιθυμητή καθώς η απόκρισή τους συχνά αλλάζει με το χρόνο ως συνέπεια φθοράς, διάβρωσης ή κακής χρήσης.

**Προσωπικά:** Τα προσωπικά σφάλματα προέρχονται από τις εκτιμήσεις που πρέπει να κάνει ο αναλυτής για το πείραμα. Παραδείγματα αποτελούν ο προσδιορισμός της θέσης μιας βελόνας οργάνου μεταξύ δυο υποδιαίρέσεων μιας κλίμακας, το χρώμα ενός διαλύματος στο τελικό σημείο μια τιτλοδότησης, το επίπεδο του υγρού σε σχέση με μια υποδιαίρεση ενός σιφωνίου ή η σχετική ένταση μεταξύ δυο δεσμών φωτός. Αχρωματοψία ή άλλες φυσικές αδυναμίες αυξάνουν σημαντικά τα προσωπικά σφάλματα. Μια σχεδόν γενικευμένη αιτία προσωπικών σφαλμάτων είναι η προκατάληψη. Οι περισσότεροι αναλυτές έχουν μια φυσική τάση να εκτιμούν τις αναγνώσεις κλιμάκων προς την κατεύθυνση εκείνη που βελτιώνει την πιστότητα σε μια σειρά δεδομένων ή οδηγεί τα αποτελέσματα πλησιέστερα προς την επιθυμητή τιμή. Τα περισσότερα προσωπικά σφάλματα μπορούν να ελαχιστοποιηθούν με προσοχή και αυτοπειθαρχία ή μέσα από αυτοματοποιημένα συστήματα συλλογής δεδομένων.

**Μεθοδολογικά:** Τα μεθοδολογικά σφάλματα συχνά προκαλούνται από μη ιδανική χημική και φυσική συμπεριφορά των αντιδραστηρίων και των αντιδράσεων πάνω στην οποία βασίζεται μια ανάλυση. Πιθανές αιτίες περιλαμβάνουν την επιβράδυνση ή μη ολοκλήρωση των χημικών αντιδράσεων, απώλειες λόγω πτητικότητας, προσρόφηση του αναλύτη σε στερεές επιφάνειες, αστάθεια των αντιδραστηρίων, προσμίξεις και χημικές παρεμποδίσεις. Τα συστηματικά μεθοδολογικά σφάλματα είναι συχνά δύσκολο να ανιχνευθούν και να διορθωθούν. Ο καλύτερος και ασφαλέστερος τρόπος είναι η επικύρωση (validation) της μεθόδου χρησιμοποιώντας για την ανάλυση πρότυπα δείγματα, που είναι παρόμοια στη χημική σύσταση και στη φυσική κατάσταση με τα προς ανάλυση δείγματα. Η συγκέντρωση του αναλύτη στα πρότυπα αυτά δείγματα πρέπει να είναι γνωστή και με μεγάλη ακρίβεια. Για απλά σώματα, τα πρότυπα δείγματα μπορούν να παρασκευαστούν με προσεκτική ανάμιξη

συγκεκριμένων ποσοτήτων από καθαρές ουσίες. Δυστυχώς, τις περισσότερες φορές τα δείγματα είναι ιδιαίτερα πολύπλοκα και η προηγούμενη προσέγγιση δεν είναι τόσο απλή.

#### 6.5. Επαναληψιμότητα και Αναπαραγωγιμότητα

Η **επαναληψιμότητα** περιγράφει τη συγκέντρωση των μετρήσεων γύρω από την κεντρική τιμή, με άλλα λόγια τη συμφωνία μεταξύ των αριθμητικών τιμών για δύο ή περισσότερες επαναλαμβανόμενες μετρήσεις, που έχουν ληφθεί υπό τις ίδιες ακριβώς συνθήκες (ίδιο όργανο, ίδιος αναλυτής και σε σύντομο χρονικό διάστημα). Γενικά, η επαναληψιμότητα της αναλυτικής μεθόδου λαμβάνεται εύκολα με απλή επανάληψη της μέτρησης. Τρεις όροι χρησιμοποιούνται για να περιγράψουν την επαναληψιμότητα μιας ομάδας πειραματικών δεδομένων: η τυπική απόκλιση (standard deviation), η μεταβλητότητα ή διακύμανση (variance) και ο συντελεστής μεταβλητότητας ή διακύμανσης (coefficient of variation, CV) (Skoog et al., 2005). Ως **αναπαραγωγιμότητα** (reproducibility) ορίζεται το μέτρο διασποράς των αποτελεσμάτων διαδοχικών ελέγχων στο ίδιο δείγμα κάτω από διαφορετικές συνθήκες (αλλάζει ένας τουλάχιστον εκ των 3 παραγόντων επαναληψιμότητας) (Οδηγία 2002/657/EK). Η επαναληψιμότητα και η αναπαραγωγιμότητα συνιστούν την πιστότητα μιας αναλυτικής μεθόδου.

#### 6.6. Ευαισθησία

Ως **ευαισθησία** ενός οργάνου ή μιας αναλυτικής μεθόδου ορίζεται το μέτρο της ικανότητάς τους να διακρίνουν μικρές διαφορές στη συγκέντρωση του αναλύτη. Δυο παράγοντες καθορίζουν την ευαισθησία: η κλίση της καμπύλης βαθμονόμησης και η επαναληψιμότητα της συσκευής μέτρησης. Μεταξύ δύο μεθόδων που παρουσιάζουν την ίδια επαναληψιμότητα, η πιο ευαίσθητη είναι εκείνη η οποία έχει καμπύλη βαθμονόμησης με τη μεγαλύτερη κλίση. Αντίστοιχα, εάν οι δύο μέθοδοι έχουν καμπύλες βαθμονόμησης με ίσες κλίσεις, η πιο ευαίσθητη είναι εκείνη με την καλύτερη επαναληψιμότητα.

#### 6.7. Όριο ανίχνευσης και Δυναμική περιοχή

Το **όριο ανίχνευσης** αποτελεί την ελάχιστη συγκέντρωση ή μάζα του αναλύτη, η οποία μπορεί να ανιχνευθεί με καθορισμένη στάθμη (ή επίπεδο) εμπιστοσύνης. Το όριο εξαρτάται από τον λόγο της τιμής του αναλυτικού σήματος προς το μέγεθος των στατιστικών διακυμάνσεων του σήματος του τυφλού. Εάν το σήμα δεν είναι μεγαλύτερο από το σήμα του τυφλού κατά ένα πολλαπλάσιο της μεταβλητότητας του τυφλού, λόγω σφαλμάτων, είναι αδύνατη η ανίχνευση αναλυτικού σήματος με βεβαιότητα (Skoog et al., 2005)

**Δυναμική περιοχή (γραμμικότητα):** Η δυναμική περιοχή μιας αναλυτικής μεθόδου είναι περιοχή η οποία εκτείνεται από τη μικρότερη συγκέντρωση στην οποία μπορεί να πραγματοποιηθεί ποσοτική μέτρηση, γνωστή ως **όριο ποσοτικοποίησης** (limit of quantitation, LOQ), έως τη συγκέντρωση στην οποία η καμπύλη βαθμονόμησης αποκλίνει από τη γραμμικότητα, γνωστή ως **όριο γραμμικότητας** (limit of linearity, LOL). Το κατώτερο όριο ποσοτικών μετρήσεων γενικά θεωρείται ότι είναι το δεκαπλάσιο της τυπικής απόκλισης του τυφλού. Για να είναι χρήσιμη μια αναλυτική μέθοδος θα πρέπει να διαθέτει δυναμική περιοχή

που να καλύπτει τουλάχιστον δύο τάξεις μεγέθους. Μερικές μέθοδοι μπορούν να εφαρμοσθούν σε δυναμική περιοχή συγκεντρώσεων που καλύπτει πέντε έως έξι τάξεις μεγέθους (Skoog et al., 2005)

#### 6.8. Εξειδίκευση και Εκλεκτικότητα

Η **εξειδίκευση** και η **εκλεκτικότητα** αφορούν την ικανότητα της μεθόδου να διακρίνει έναν αναλύτη από τους υπόλοιπους αναλύτες ή από γνωστές προσμίξεις, μεταβολίτες, προϊόντα διάσπασης και συστατικά του μητρικού υλικού του δείγματος. Για χρωματογραφικές μεθόδους η εξειδίκευση ελέγχεται με τη διαχωριστική ικανότητα ( $R_s$ ) της στήλης. Στη χρωματογραφία ο έλεγχος της εξειδίκευσης πρέπει να αποδεικνύει την καθαρότητα της χρωματογραφικής κορυφής, δηλαδή, ότι η κορυφή αυτή προέρχεται από ένα μόνο συστατικό. Σε μίγμα πολλών ουσιών πολλές από τις οποίες συνεκκλούνται, η εξειδίκευση μπορεί πιο εύκολα να αποδειχθεί με χρήση δύο στηλών διαφορετικής πολικότητας. Με τις τεχνικές φασματομετρίας μάζας η εξειδίκευση αυξάνεται σε μέγιστο βαθμό, πρέπει όμως και πάλι να αποδεικνύεται, π.χ. με τη χρήση της αναλογίας των δύο σημαντικότερων ιόντων (Οδηγία 2002/657/EK). Η εκλεκτικότητα μιας αναλυτικής μεθόδου αναφέρεται στο βαθμό στον οποίο η μέθοδος είναι απαλλαγμένη παρεμποδίσεων από άλλες ουσίες, οι οποίες βρίσκονται στη μήτρα του δείγματος. Δυστυχώς καμία αναλυτική μέθοδος δεν είναι τελείως απαλλαγμένη από παρεμποδίσεις άλλων ουσιών και συχνά πρέπει να λαμβάνονται μέτρα για να ελαχιστοποιηθούν αυτές οι παρεμποδίσεις (Skoog, et al., 2005).

#### 6.9. Μέθοδος εσωτερικού προτύπου

**Η μέθοδος εσωτερικού προτύπου:** Το εσωτερικό πρότυπο (internal standard, IS) είναι μια ουσία που προστίθεται σε σταθερή ποσότητα σε όλα τα δείγματα, τα τυφλά και τα πρότυπα βαθμονόμησης κατά την ανάλυση. Εναλλακτικά, μπορεί να είναι ένα κύριο συστατικό των δειγμάτων και των προτύπων, το οποίο βρίσκεται σε μεγάλη ποσότητα, ώστε η συγκέντρωσή του να μπορεί να θεωρηθεί ίδια σε όλες τις περιπτώσεις.

Η βαθμονόμηση πραγματοποιείται με την κατασκευή διαγράμματος του λόγου (σήμα αναλύτη) / (σήμα εσωτερικού προτύπου) ως προς τη συγκέντρωση του αναλύτη στα πρότυπα. Ο ίδιος λόγος μετρείται σε κάθε δείγμα και από την καμπύλη βαθμονόμησης υπολογίζεται η αντίστοιχη συγκέντρωση του αναλύτη. Το εσωτερικό πρότυπο, εάν επιλεγεί και χρησιμοποιηθεί σωστά, μπορεί να αντισταθμίσει αρκετά τυχαία και συστηματικά σφάλματα. Έτσι, εάν τα σήματα του αναλύτη και του εσωτερικού προτύπου αποκρίνονται αναλογικά σε τυχαίες οργανολογικές και μεθοδολογικές διακυμάνσεις, ο λόγος των σημάτων παραμένει σταθερός και ανεξάρτητος των διακυμάνσεων αυτών. Εάν και τα δύο σήματα επηρεάζονται το ίδιο από την επίδραση της μήτρας, πάλι η δράση αυτή όσον αφορά τον λόγο των σημάτων αντισταθμίζεται. Σε περιπτώσεις που το εσωτερικό πρότυπο αποτελεί κύριο συστατικό δειγμάτων και προτύπων, συμβαίνει πάλι αντιστάθμιση σφαλμάτων που προκύπτουν κατά την προετοιμασία των δειγμάτων και των διαλυμάτων.

Βασική δυσκολία κατά την εφαρμογή της μεθόδου εσωτερικού προτύπου είναι η εξεύρεση κατάλληλης ουσίας, που μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως εσωτερικό πρότυπο και η εισαγωγή της τόσο στα δείγματα, όσο και στα πρότυπα με τον πιο επαναλήψιμο τρόπο. Το εσωτερικό πρότυπο θα πρέπει να παρέχει σήμα με παρόμοια χαρακτηριστικά με το σήμα του αναλύτη (π.χ. να υφίσταται την ίδια επίδραση από άλλες ουσίες και από διακυμάνσεις οργανολογικών παραμέτρων), αλλά θα πρέπει να διακρίνεται από αυτό έτσι, ώστε κάθε σήμα (αναλύτη και εσωτερικού προτύπου) να μπορεί να μετρηθεί ξεχωριστά. Επίσης, πρέπει να είναι βέβαιο ότι η ουσία που χρησιμοποιείται ως εσωτερικό πρότυπο δεν βρίσκεται στη μήτρα του δείγματος έτσι, ώστε η συγκέντρωση του εσωτερικού προτύπου να υπολογίζεται αποκλειστικά από τις προστιθέμενες ποσότητές του. Με κατάλληλο εσωτερικό πρότυπο μπορούν να επιτευχθούν σχετικές επαναληψιμότητες καλύτερες από 1 % (Skoog, et al., 2005)

## ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### 7. Χημικά και εξοπλισμός

#### 7.1. Υλικά και εργαστηριακές συσκευές

Φίλτρα διήθησης Membrane Filters Nylon με διάμετρο πόρων 0,45μm.

Φίλτρα σύριγγας, λευκά, Chromafil Xtra PTFE-45/13 HPLC certified.

Αυτόματες πιπέτες μεταβλητού όγκου 1-10 μL, 10 – 100 μL και 100 – 1000 μL της Gilson (κατάλληλες και για οργανικούς διαλύτες).

Αναλυτικός ηλεκτρονικός ζυγός AB135-S/FACT της Mettler Toledo πέντε δεκαδικών ψηφίων για τη ζύγιση αναλυτικών προτύπων, αντιδραστηρίων και δειγμάτων.

Αυτόματος αναδευτήρας περιδίνησης (Vortex) MS1 Minishaker της IKA Works, για την ανάδευση δειγμάτων και διαλυμάτων.

Συσκευή διήθησης διαλυτών υπό κενό (γυάλινη κατασκευή).

Φυγόκεντρος Heraeus Labofuge 400R Centrifuge της Thermo.

Ηλεκτρικός ομογενοποιητής Ultra-Turrax T25 της Janke & Kunkel.

Περιστροφικός εξατμιστήρας υπό κενό Heidolph VV2011 (Heidolph, Swabach, Germany).

Συσκευή παραγωγής υπερκάθαρου νερού SG.

Συσκευή υπερήχων Ultrasonic bath της Grant Instruments (Cambridge, United Kingdom).

#### 7.2. Διαλύτες και αντιδραστήρια

1) Ακετονιτρίλιο (CH<sub>3</sub>CN/ACN) κατάλληλο για HPLC, βαθμού καθαρότητας  $\geq 99,9$  % από την Fisher Chemical, U.K.

2) Μεθανόλη (CH<sub>3</sub>OH/MeOH) κατάλληλη για HPLC, βαθμού καθαρότητας  $\geq 99,9$  % από την Fisher Chemical, U.K.



- 3) Νερό (H<sub>2</sub>O) δις απιονισμένο, υπερκάθαρο.
- 4) n-Εξάνιο (C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>), από την Carlo Erba, Italy.
- 5) Φορμικό οξύ, από την Carlo Erba, Italy.
- 6) Θεικό Μαγνήσιο (MgSO<sub>4</sub>), βαθμού καθαρότητας  $\geq 98\%$  από την Scharlab, Spain.
- 7) Χλωριούχο Νάτριο (NaCl), βαθμού καθαρότητας 99,98% από την Fisher Chemical, U.K.
- 8) Sodium Citrate Tribasic Dihydrate (Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>•2H<sub>2</sub>O), βαθμού καθαρότητας  $\geq 99\%$  από την Carlo Erba, Italy.
- 9) Citric Acid, Disodium Salt Sesquihydrate (C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>Na<sub>2</sub>O<sub>7</sub>•1.5 H<sub>2</sub>O), βαθμού καθαρότητας 99% από την Acros Organics, Spain.
- 10) Isolute PSA, 0,40mmol/g της Biotage.
- 11) Sorbent C<sub>18</sub> Chromabond, της Macherey-Nagel, Germany.
- 12) Ammonium Formate (CH<sub>5</sub>NO<sub>2</sub>) Optima LC/MS, της Fisher Chemical, U.K.
- 13) Αέριο Άζωτο (N<sub>2</sub>) εκνέφωσης και σύγκρουσης κατάλληλο για LC-MS.
- 14) Αέριο Ήλιο (He) ως φέρον αέριο και αέριο Αργό (Ar) ως αέριο σύγκρουσης στο GC.

### 7.3. Πρότυπα διαλύματα

Οι πρότυπες ουσίες καθαρότητας >90% αγοράστηκαν από τις εταιρείες Sigma-Aldrich (Büchs, Switzerland), Dr. Ehrenstorfer GmbH (Augsburg, Germany) και Acros Organics. Για κάθε μία ουσία παρασκευάστηκε το διάλυμα παρακαταθήκης σε συγκέντρωση συνήθως 1000 ppm, και με διαδοχικές αραιώσεις τα μεμονωμένα διαλύματα εργασίας. Από αυτά στη συνέχεια παρασκευάστηκε το τελικό διάλυμα εργασίας συγκέντρωσης 3ppm, το οποίο περιείχε το μίγμα των υπό εξέταση ουσιών. Για την επικύρωση της μεθόδου και ειδικά για την μελέτη ανάκτησης χρησιμοποιήθηκαν τρία διαλύματα με συγκεντρώσεις 5ppb, 50 ppb και 500ppb. Όλες οι αραιώσεις έγιναν σε διαλύτη ACN.

Στη συγκεκριμένη εργασία, το μητρικό υλικό των δειγμάτων (μέλισσες, μέλι) λόγω της πολυπλοκότητάς του δύναται να επηρεάσει την απόκριση των αναλυτών της μεθόδου. Για αυτό το σκοπό, χρησιμοποιήθηκαν φορτισμένα πρότυπα διαλύματα ουσιών, των παραπάνω συγκεντρώσεων, σε μητρικό υλικό απαλλαγμένο από οποιαδήποτε ουσία που μελετάμε (Blank Spike).

Η διαδικασία αυτή πραγματοποιήθηκε λαμβάνοντας 1g μητρικού τυφλού υλικού μέλισσας και αντίστοιχα 5g μητρικού τυφλού υποστρώματος μελιού, και ακολουθώντας όλη την πειραματική πορεία όπως στους βομβίνους (μέλισσες) και για το μέλι που περιγράφεται παρακάτω, εμβολιάζοντας το με αντίστοιχη ποσότητα πρότυπου διαλύματος του μίγματος



φυτοφαρμάκων (που προήλθε από αραίωση διαλύματος εργασίας 3 ppm), ώστε μετά την ανασύσταση με 1 mL ACN η τελική συγκέντρωση των αναλυτών του μίγματος των φυτοφαρμάκων να είναι η εξής: 5ppb, 50ppb και 500 ppb αντίστοιχα.

Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε (εκτός της φόρτισης) για την παρασκευή των εκχυλισμάτων τυφλού δείγματος (blank extracts), τα οποία είναι αναγκαία για την προετοιμασία των εμβολιασμένων με το μίγμα φυτοφαρμάκων εκχυλισμάτων. Αυτά χρησιμοποιούνται για την κατασκευή των αντίστοιχων καμπυλών αναφοράς, αλλά και την εκτίμηση της επίδραση μήτρας (δείτε παρακάτω).

Τέλος, σε ότι αφορά τα πρότυπα διαλύματα, πρέπει να είναι ομοιόμορφα κατανεμημένα στη γραμμική περιοχή και οπωσδήποτε να περικλείουν τις αναμενόμενες συγκεντρώσεις αγνώστων. Όταν δεν τις περικλείουν ακολουθείται διαδικασία που περιγράφεται παρακάτω.

#### 7.4. Εσωτερικό πρότυπο

Η παρουσία εσωτερικού προτύπου καθίσταται αναγκαία κατά την ανάλυση δειγμάτων, ιδιαίτερα όταν αυτά προέρχονται από πολύπλοκα υποστρώματα, προκειμένου να αντισταθμιστούν απώλειες κατά το στάδιο της κατεργασίας, να εξαλειφθούν φαινόμενα καταστολής ή ενίσχυσης του σήματος που είναι συχνά στην τεχνική φασματομετρίας μαζών και ιδιαίτερα σε συστήματα που χρησιμοποιούν ως πηγή ιοντισμού τον ηλεκτροσπεκασμό και γενικά να εξασφαλιστεί η κατά το δυνατό πιο αξιόπιστη ποσοτικοποίηση των προσδιοριζόμενων ουσιών.

Τα εσωτερικά πρότυπα που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση στο LC-ESI-MS/MS ήταν τα εξής: Chlorpyrifos-d10, Carbendazim-d3 και το Imidacloprid-d4. Τα διαλύματα εργασίας των παραπάνω δευτεριωμένων ουσιών σε συγκεντρώσεις 2ppm, 1ppm και 2ppm αντίστοιχα ήταν σε διαλύτη CH<sub>3</sub>OH και προστέθηκαν στην αρχή της διαδικασίας της κατεργασίας των δειγμάτων μας. Η τελική τους συγκέντρωση στα δείγματά μας, μετά την ανασύσταση με 1 mL ACN είναι η εξής: 100ppb, 20ppb και 50 ppb αντίστοιχα.

### 8. Δειγματοληψία και κατεργασία δειγμάτων

#### 8.1. Περιοχές-Δειγματοληψία

Τα δείγματα ελήφθησαν από τα τέλη Ιουνίου έως τα μέσα Οκτωβρίου του 2018 στην ευρύτερη περιοχή των Χανίων, Κρήτης, έπειτα από τις εφαρμογές που πραγματοποιήθηκαν σε ποικιλία

ελιάς Κορωνέικη. Το ένα αγροτεμάχιο αποτελείτο από 3000 δέντρα (συντεταγμένες 35°28'36.71"B 23°44'19.52"A) και αφορούσε τους δολωματικούς ψεкасμούς. Το κτήμα των ψεкасμών καλύψεως (35°28'40.66"B 23°45'48.57"A) διέθετε ανάλογο αριθμό δένδρων. Τέλος, ανάλογης έκτασης αγροτεμάχιο (35°28'48.24"B 23°44'37.74"A) στο οποίο δεν έγιναν (κατά δήλωση των ιδιοκτητών) εφαρμογές-ψεкасμοί χρησιμοποιήθηκε για την δειγματοληψία των αντίστοιχων δειγμάτων.

Σε ότι αφορά τις μέλισσες και το μέλι, σε κάθε πειραματικό ελαιώνα τοποθετήθηκαν 5 κυψέλες με 10αρια πλαίσια, και ελήφθησαν 10 ζωντανές μέλισσες/κυψέλη, και ένα μικρό βαζάκι μέλι σχεδόν κάθε βδομάδα. Συνολικά δηλαδή από κάθε μεταχείριση ελήφθησαν 50 μέλισσες και 5 δείγματα μελιού.

Σε ότι αφορά τους βομβίνους, μία κυψέλη τοποθετήθηκε στις αρχές Σεπτεμβρίου 2018, και ελήφθησαν περίπου 5 βομβίνοι/κυψέλη (τοποθετήθηκαν αρχικά 2-3 κυψέλες/μεταχείριση αλλά λόγω καταστροφών των κυψελών από άλλους παράγοντες τελικά διατηρήθηκε 1 κυψέλη για τις δειγματοληψίες).

Τα δείγματα μετά τη δειγματοληψία στο πεδίο και την επακόλουθη συσκευασία τοποθετήθηκαν σε ψυγείο από φελλίζολ το οποίο ήταν εφοδιασμένο με ξηρό πάγο ώστε να διατηρείται η θερμοκρασία στους -80 °C και να αποφεύγεται η αποικοδόμηση των χημικών ενώσεων. Τα δείγματα μετά την αρχική τους αποθήκευση στο πεδίο, μεταφέρθηκαν αρχικά στο Εργαστήριο, και μετά με δύο αποστολές στο Εργαστήριο Τοξικολογικού Ελέγχου Γεωργικών Φαρμάκων.

## 8.2. Κατεργασία δειγμάτων

Για την κατεργασία των δειγμάτων (όλων των υποστρωμάτων), εφαρμόσαμε την τεχνική QuEChERS με τις τροποποιήσεις τις όπως εφαρμόζονται στο Εργαστήριο Τοξικολογικού Ελέγχου Γεωργικών Φαρμάκων του ΜΦΙ (Kasiotis et al., 2014, 2018), λαμβάνονται υπόψη και την δημοσιευμένη επιστημονική εργασία των L. Wiest et al.

### 8.2.1. Κατεργασία δείγματος μέλισσας

Σε φυγοκεντρικό σωλήνα χωρητικότητας 50mL τοποθετούνται 5 g δείγματος μέλισσας. Στη συνέχεια προστίθενται τα εσωτερικά πρότυπα, 50  $\mu$ L Chlorpyrifos-d10, 20 $\mu$ L Carbendazim-d3 και 25 $\mu$ L Imidacloprid-d4 και περιμένουμε 1 min προκειμένου να εξατμιστεί ο διαλύτης (CH<sub>3</sub>OH). Εν συνεχεία, προστίθενται 3 mL υπερκάθαρου H<sub>2</sub>O και το μίγμα κονιορτοποιείται

με υάλινη ράβδο. Κατόπιν, προστίθενται με σιφώνι 10 mL ACN και 3 mL n-Hexane και για 5 min το προκύπτον μίγμα ομογενοποιείται σε ομογενοποιητή Ultra-Turrax. Ακολούθως, το μίγμα μεταφέρεται σε πλαστικό φυγοκεντρικό σωλήνα χωρητικότητας 50mL ο οποίος περιέχει 4 g MgSO<sub>4</sub>, 1 g NaCl, 1 g Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub> • 2H<sub>2</sub>O και 500mg C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>Na<sub>2</sub>O<sub>7</sub> • 1.5 H<sub>2</sub>O. Κατόπιν αναδεύουμε έντονα με το χέρι για 1min, το τοποθετούμε στο vortex για 5min και αμέσως στην φυγόκεντρο, ρυθμισμένη για 5min στους 10°C στις 4500 rpm.

Στη συνέχεια, η υπερκείμενη στιβάδα του n-Hexane στην οποία περιέχονται τα λιπαρά συστατικά του δείγματος και πιθανά ίχνη κεριού, απομακρύνονται και απορρίπτονται με πιπέτα Pasteur. Η στιβάδα του ACN, στην οποία είναι συγκεντρωμένες οι ουσίες που μας ενδιαφέρουν, μεταφέρεται σε δεύτερο πλαστικό φυγοκεντρικό σωλήνα ο οποίος περιέχει 900mg MgSO<sub>4</sub>, 150mg PSA και 150mg C18. Ακολουθεί ανακίνηση με το χέρι για 1min και έντονη ανάδευση στον αναδευτήρα περιδίνησης (vortex) για 5min. Έπειτα το μίγμα φυγοκεντρείται σε φυγόκεντρο η οποία είναι ρυθμισμένη για 5min στους 10°C στις 4500 rpm. Στη συνέχεια μεταφέρουμε το υπερκείμενο σε σφαιρική υάλινη φιάλη και εξατμίζουμε μέχρι ξηρού. Ακολουθεί ανασύσταση του δείγματος με 1mL ACN (HPLC grade) και μεταφορά σε υάλινο vial κατάλληλο για έγχυση στο HPLC-MS/MS και στα συστήματα GC-MS/MS και GC-ECD.

#### *8.2.2. Κατεργασία δειγμάτων μελιού*

Σε φυγοκεντρικό σωλήνα χωρητικότητας 50mL τοποθετούμε 5 g δείγματος μελιού. Το μεταφέρουμε σε λουτρό υπερήχων για 5min στους 30°C ώστε να πετύχουμε καλύτερη ομογενοποίηση του δείγματος χρήσιμη κατά τη διαδικασία της προσθήκης των εσωτερικών προτύπων και της εκχύλισης. Στη συνέχεια προσθέτουμε τα εσωτερικά πρότυπα ως εξής: 50 μL Chlorpyrifos d10, 20μL Carbendazim d3 και 25μL Imidacloprid d4 και περιμένουμε 20min προκειμένου να εξατμιστεί ο διαλύτης (CH<sub>3</sub>OH). Προσθέτουμε 10 mL H<sub>2</sub>O υπερκάθαρο και κονιορτοποιούμε με υάλινη ράβδο. Κατόπιν, προσθέτουμε με σιφώνιο, 10 mL ACN και 3 mL n-Hexane και για 5min ομογενοποιούμε στο Ultra-Turrax. Ακολούθως, το μίγμα μεταφέρεται σε πλαστικό φυγοκεντρικό σωλήνα χωρητικότητας 50mL ο οποίος περιέχει 4 g MgSO<sub>4</sub>, 1 g NaCl, 1 g Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub> • 2H<sub>2</sub>O και 500mg C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>Na<sub>2</sub>O<sub>7</sub> • 1.5 H<sub>2</sub>O. Στη συνέχεια αναδεύουμε έντονα με το χέρι για 1min, το τοποθετούμε στον αναδευτήρα περιδίνησης (vortex) για 5min και αμέσως στην φυγόκεντρο, ρυθμισμένη για 5min στους 10°C στις 4500 rpm.

Στη συνέχεια, απομακρύνουμε και απορρίπτουμε με πιπέτα Pasteur την υπερκείμενη στιβάδα του n-Hexane στην οποία περιέχονται τα λιπαρά συστατικά του δείγματος και πιθανά ίχνη

κεριού. Την στιβάδα του ACN, στην οποία είναι συγκεντρωμένες οι ουσίες που μας ενδιαφέρουν, την μεταφέρουμε σε δεύτερο πλαστικό centrifuge tube το οποίο περιέχει 900mg  $\text{MgSO}_4$ , 150mg PSA και 150mg C18. Ακολουθεί ανακίνηση με το χέρι για 1min και έντονη ανάδευση στον αναδευτήρα περιδίνησης (vortex) για 5min και το τοποθετούμε στη φυγόκεντρο η οποία είναι ρυθμισμένη για 5min στους  $10^\circ\text{C}$  στις 4500 rpm.

Στη συνέχεια μεταφέρουμε το υπερκείμενο σε σφαιρική υάλινη φιάλη και εξατμίζουμε μέχρι ξηρού. Ακολουθεί ανασύσταση του δείγματος με 1mL ACN (HPLC grade) και μεταφορά σε υάλινο φιαλίδιο κατάλληλο για έγχυση στο HPLC-MS/MS και στα συστήματα GC-MS/MS και GC-ECD.

### *8.2.3. Κατεργασία δειγμάτων βομβίνων*

Σε φυγοκεντρικό σωλήνα χωρητικότητας 50mL τοποθετούμε 1 g δείγματος βομβίνων. Στη συνέχεια προσθέτουμε τα εσωτερικά πρότυπα, 50  $\mu\text{L}$  Chlorpyrifos d10, 20 $\mu\text{L}$  Carbendazim d3 και 25 $\mu\text{L}$  Imidacloprid d4 και περιμένουμε 1 min προκειμένου να εξατμιστεί ο διαλύτης ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ). Προσθέτουμε 3 mL  $\text{H}_2\text{O}$  υπερκάθαρου και κονιορτοποιούμε με υάλινη ράβδο (πιο έντονα σε σχέση με τις μέλισσες). Κατόπιν, προσθέτουμε με σιφόνιο, 7 mL ACN και 3 mL n-Hexane και για 5 min ομογενοποιούμε στον Ultra-Turrax. Ακολούθως, μεταφέρουμε σε φυγοκεντρικό σωλήνα χωρητικότητας 50mL ο οποίος περιέχει 1 g  $\text{MgSO}_4$ , 500 mg NaCl, 500mg  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  και 250mg  $\text{C}_6\text{H}_6\text{Na}_2\text{O}_7 \cdot 1.5 \text{H}_2\text{O}$ . Στη συνέχεια αναδεύουμε έντονα με το χέρι για 1min, το τοποθετούμε στον αναδευτήρα περιδίνησης (vortex) για 5min και αμέσως στην φυγόκεντρο, ρυθμισμένη να λειτουργεί για 5min στους  $10^\circ\text{C}$  στις 4500 rpm.

Στη συνέχεια, απομακρύνουμε και απορρίπτουμε με πιπέτα Pasteur την υπερκείμενη στιβάδα του n-Hexane στην οποία περιέχονται τα λιπαρά συστατικά του δείγματος και πιθανά ίχνη κεριού. Την στιβάδα του ACN, στην οποία είναι συγκεντρωμένες οι ουσίες που μας ενδιαφέρουν, την μεταφέρουμε σε δεύτερο φυγοκεντρικό σωλήνα ο οποίος περιέχει 500mg  $\text{MgSO}_4$ , 50mg PSA και 50mg C18. Ακολουθεί ανακίνηση με το χέρι για 1min και έντονη ανάδευση στον αναδευτήρα περιδίνησης (vortex) για 5min και το τοποθετούμε στη φυγόκεντρο η οποία είναι ρυθμισμένη να λειτουργεί για 5min στους  $10^\circ\text{C}$  στις 4500 rpm.

Στη συνέχεια μεταφέρουμε το υπερκείμενο σε σφαιρική υάλινη φιάλη και εξατμίζουμε μέχρι ξηρού. Ακολουθεί ανασύσταση του δείγματος με 1mL ACN (HPLC-MS grade) και μεταφορά σε υάλινο φιαλίδιο κατάλληλο για έγχυση στο HPLC-MS/MS και στα συστήματα GC-MS/MS και GC-ECD.

## 9. Οργανολογία

### 9.1.HPLC-ESI-MS/MS

#### Προετοιμασία συστήματος υγρής χρωματογραφίας

1. Παρασκευή επαρκούς ποσότητας από το σύστημα διαλυτών που αποτελούν την κινητή φάση του συστήματος της υγρής χρωματογραφίας

*Οργανική φάση:* Σε 1000mL CH<sub>3</sub>OH προστίθενται 314mg φορμικού αμμωνίου και μετά από έντονη ανακίνηση ακολουθεί διήθηση υπό κενό. Μόλις ολοκληρωθεί η διήθηση, προστίθεται 1 mL φορμικό οξύ.

*Υδατική φάση:* Σε 1000mL υπερκάθαρο H<sub>2</sub>O, προστίθενται 314mg φορμικό αμμώνιο και 200  $\mu$ L ACN και μετά από έντονη ανακίνηση ακολουθεί διήθηση υπό κενό. Μόλις ολοκληρωθεί η διήθηση, προστίθεται 1 mL φορμικό οξύ.

2. Ενημέρωση του λογισμικού του οργάνου με τον ακριβή όγκο του διαλύτη σε καθέναν από τους δύο διαλύτες

3. Έκπλυση της διαδρομής του δείγματος με διάλυμα κινητής φάσης

Για 5min με ροή 4 mL/min ρέει μόνο η υδατική φάση, ακολούθως για 5min με ροή 4 mL/min ρέει 50% η υδατική και 50% η οργανική και στα τελευταία 5min της διαδικασίας με ροή 4 mL/min ρέει μόνο η οργανική φάση. Τα εκλούσματα των κινητών φάσεων είναι ρυθμισμένο το σύστημα ώστε να καταλήγουν στα απόβλητα και όχι στον αναλυτή μαζών.

4. Εισαγωγή της μεθόδου που θα εφαρμόσουμε για την ανάλυση των δειγμάτων αφού έχει σταθεροποιηθεί στην επιθυμητή πίεση και έχουν καταχωρηθεί τα δείγματα προς ανάλυση.

#### Σύστημα HPLC-MS/MS

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε το σύστημα 6410 Triple Quad LC/MS της εταιρείας Agilent Technologies που περιλαμβάνει σύστημα υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) συνδεδεμένο με τετραπολικό φασματόμετρο μαζών (τριπλό τετράπολο, triple quadrupole).

#### *9.1.1. Λειτουργία συστήματος υγρής χρωματογραφίας*

Το σύστημα υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (1200 LC Series Agilent Technologies, Santa Clara, USA) αποτελείται από σύστημα παροχής διαλυτών (4 ανεξάρτητων καναλιών διαλύτη) με ανάμιξη υπό υψηλή πίεση με τη χρήση δυαδικής αντλίας (binary pump), με δυνατότητα βαθμιδωτής έκλουσης, εφοδιασμένο με αυτόματο δειγματολήπτη 100 θέσεων με



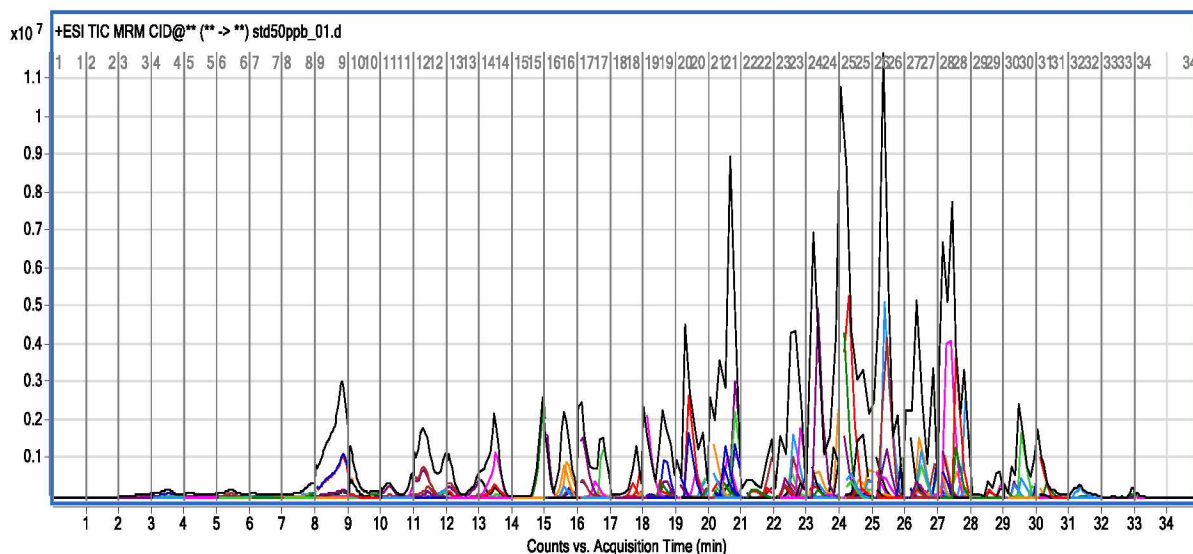
δυνατότητα ρύθμισης του όγκου ένεσης έως και 100  $\mu\text{L}$  και θερμοστατούμενο θάλαμο τοποθέτησης της χρωματογραφικής στήλης.

Η αναλυτική στήλη που χρησιμοποιήθηκε (ZORBAX Eclipse XDB-C<sub>18</sub>, 2.1×150mm, 3.5 $\mu$  Agilent) ήταν ανάστροφής φάσης, η οποία έφερε ως υλικό πλήρωσης το C<sub>18</sub>. Η θερμοκρασία της στήλης διατηρήθηκε στους 30 °C, μέσα στον θερμοστατούμενο θάλαμο καθ' όλη τη διάρκεια της χρωματογραφικής ανάλυσης. Η κινητή φάση αποτελείται από τον διαλύτη Α) Νερό υπερκάθαρο που περιέχει 5 mM φορμικό αμμώνιο, 0.1% φορμικό οξύ, 0.02% ακετονθρίλιο και τον διαλύτη Β) μεθανόλη που περιέχει 5 mM φορμικό αμμώνιο και 0.1% φορμικό οξύ. Η μέθοδος που εφαρμόστηκε για την ανίχνευση των ουσιών που μας ενδιαφέρουν, dimethoate και omethoate, περιλαμβάνει τη βαθμιδωτή έκλυση με διατήρηση ροής της κινητής φάσης στα 0,3 mL/min, όπου συγκεκριμένα από 0-20 min η κινητή φάση αποτελείται από 20% Β, 2-12 min αυξάνεται από στο 60% η Β, 12-30 min αυξάνεται από 60 στο 100% η Β, και 30-35 min η κινητή φάση αποτελείται από σταθερή σύσταση 100% Β. Έπειτα το σύστημα διατηρεί ροή με την για 10 min ώστε να εξισορροπηθεί η πίεση και το χρωματογραφικό σύστημα να είναι έτοιμο για την επόμενη ανάλυση. Ο όγκος του ενέσιμου δείγματος τέθηκε στα 10  $\mu\text{L}$ . Για την αποφυγή επιμόλυνσης κατά τη δειγματοληψία, το σύστημα επιτρέπει τη δυνατότητα έκπλυσης της βελόνας με κατάλληλο διαλύτη (μεθανόλη στη συγκεκριμένη ανάλυση, σε φιαλίδιο τοποθετημένο σε ειδική θέση στον αυτόματο δειγματολήπτη), μεταξύ δύο δειγματοληψιών. Στο τέλος της ανάλυσης όλης της σειράς των δειγμάτων, ρυθμίζεται το σύστημα ώστε η ροή της κινητής φάσης να εκτρέπεται στα απόβλητα και όχι στον ανιχνευτή μαζών, ώστε τυχόν υπολείμματα να μην οδηγούνται στον ανιχνευτή μαζών και εντέλει να μην επηρεάζουν τον ανιχνευτή και τις επόμενες αναλύσεις.

#### *9.1.2. Λειτουργία συστήματος φασματομετρίας μαζών*

Το παραπάνω σύστημα ήταν συζευγμένο με σύστημα διαδοχικής φασματομετρίας μαζών (MS/MS) 6410 Triple Quad LC/MS (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) με πηγή ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό ή ηλεκτροδιάχυσης (ESI) παραγωγής ιόντων. Το συγκεκριμένο σύστημα διαθέτει τετραπολικό αναλυτή μαζών και χρησιμοποιεί σαν αέριο εκνέφωσης στην πηγή ιοντισμού το άζωτο, όσο και στον θάλαμο συγκρούσεων ως αέριο σύγκρουσης. Τα φάσματα ελήφθησαν αφού εφαρμόστηκε στη μέθοδό μας η «παρακολούθηση πολλαπλών μεταπτώσεων ή αντιδράσεων θραυσματοποίησης ιόντων» (Multiple Reaction Monitoring, MRM, παρατίθεται εικόνα TIC και MRM χρωματογραφημάτων σε διάλυμα μίγματος 270 φυτοφαρμάκων).

Η διαδικασία της χρωματογραφικής ανάλυσης, η επεξεργασία των ληφθέντων χρωματογραφημάτων και φασμάτων, πραγματοποιήθηκε με τη χρήση των εξής λογισμικών Agilent Mass Hunter data acquisition Triple Quad B.01.04 και Agilent Mass Hunter Workstation Qualitative & Quantitative Analysis B.01.04 της εταιρείας Agilent Technologies και το πρόγραμμα Chemstation (Agilent).



**Εικόνα.** Επικαλυπτόμενα LC-ESI-MS/MS, TIC και MRM χρωματογραφήματα μίγματος 270 φυτοφαρμάκων και μεταβολιτών σε διαλύτη ακετονιτρίλιο (από μέθοδο που εφαρμόζεται στο Εργαστήριο).

## 9.2. GC-MS/MS

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε το σύστημα 5975 B inert XL EI/CI MSD system της εταιρείας Agilent που περιλαμβάνει σύστημα αέριας χρωματογραφίας (GC) συνδεδεμένο με τετραπολικό φασματόμετρο μαζών με αναλυτή τριπλό τετράπολο (αναβαθμισμένο σε τριπλό τετράπολο από την εταιρεία Chromtech, Evolution 3 MS/MS) για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση των δραστικών ουσιών των εξής πυρεθροειδών: β-cyfluthrin, λ-cyhalothrin. Για τον διαχωρισμό των ουσιών χρησιμοποιήθηκε η στήλη HP-5ms ultra inert UI, μήκους 30m, εσωτερικής διαμέτρου 0.25mm, με μέγεθος σωματιδίων 25 μm (particle size) (Agilent Technologies). Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα που ακολουθήθηκε και χρησιμοποιείται ευρύτερα από το εργαστήριο στην εφαρμογή διαχωρισμού ποικίλων πυρεθροειδών και άλλων οργανικών ρυπαντών είναι το ακόλουθο:

Εκκίνηση στους 50°C στους οποίους το σύστημα μένει για 1 min, αύξηση στους 125°C με βήμα 25°C min<sup>-1</sup>, και έπειτα αύξηση έως τους 300°C με ρυθμό αύξησης της θερμοκρασίας 10°C min<sup>-1</sup>. Ο συνολικός χρόνος ανάλυσης είναι 36,5 min.

Η κινητή φάση αποτελείται από το φέρον αέριο He με διατήρηση της ροής του στα 1,2mL/min καθ' όλη τη διάρκεια της ανάλυσης. Ο όγκος του ενέσιμου δείγματος ήταν τα 2  $\mu$ L και πραγματοποιείται με ρομποτικό αυτόματο δειγματολήπτη (Gerstel MPS-2 autosampler). Για την αποφυγή επιμόλυνσης κατά τη δειγματοληψία, και μετά την έγχυση, το σύστημα επιτρέπει τη δυνατότητα έκπλυσης της βελόνας με κατάλληλο διαλύτη (εξάνιο και ακετόνη, στη συγκεκριμένη ανάλυση, σε φιαλίδια τοποθετημένο σε ειδικές θέσεις), πριν και μετά την χημική ανάλυση και μεταξύ των διαδοχικών δειγματοληψιών.

#### *Λειτουργία συστήματος φασματομετρίας μαζών*

Το παραπάνω σύστημα ήταν συνδεδεμένο με σύστημα διαδοχικής φασματομετρίας μαζών (MS/MS) με πηγή ιοντισμού πρόσκρουσης ηλεκτρονίων. Τα φάσματα ελήφθησαν αφού εφαρμόστηκε στη μέθοδο η «παρακολούθηση πολλαπλών μεταπτώσεων ή αντιδράσεων θραυσματοποίησης ιόντων» (Multiple Reaction Monitoring, MRM). Στο συγκεκριμένο σύστημα χρησιμοποιείται ως αέριο σύγκρουσης αργό (Ar) πολύ υψηλής καθαρότητας (99,999%). Η πίεση στο θάλαμο συγκρούσεων διατηρείται στα 1.7mTorr. Ο συνολικός χρόνος ανάλυσης διαρκεί 36 min. Η διαδικασία της χρωματογραφικής ανάλυσης, η επεξεργασία των ληφθέντων χρωματογραφημάτων και φασμάτων, πραγματοποιήθηκε με τη χρήση των εξής λογισμικών: Για την πραγματοποίηση της χημικής ανάλυσης χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό Evolution 3 (Chromtech, Germany) και για την επεξεργασία των δεδομένων (ποιοτική και ποσοτική ανάλυση) το λογισμικό Agilent Mass Hunter Workstation Qualitative & Quantitative Analysis B.01.04 της εταιρείας Agilent Technologies προσαρμοσμένο από την εταιρεία Chromtech στις ανάγκες του αναβαθμισμένου σε MS/MS σύστημα της Chromtech. Το εξαγόμενο χρωματογράφημα ιόντων (extracted ion chromatogram, EIC) χρησιμοποιήθηκε για τη μέτρηση του εμβαδού κορυφής του πιο άφθονου ιόντος κάθε αναλύτη.

#### *9.2.1. GC-ECD*

Οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας χρωματογραφικό σύστημα (Agilent 6890 chromatographic system) συνδεδεμένο με ανιχνευτή ECD, και σύστημα έγχυσης με διαμοιραστή ροής (splitless injector mode). Ο διαχωρισμός πραγματοποιήθηκε σε στήλη DB-5-MS column (30 m, 0.32 mm i.d. και 0.25  $\mu$ m film thickness). Το χρωματογραφικό σύστημα ελέγχεται με το λογισμικό Chemstation chromatography manager and processing software. Ως φέρον αέριο χρησιμοποιήθηκε το ήλιο με ροή 1.5 mL/min. Η θερμοκρασία του εισαγωγέα τέθηκε στους 230 °C και η έγχυση με διαμοιραστή ροής πραγματοποιήθηκε με τη βαλβίδα καθαρισμού (purge valve) κλειστή για 1 min. Ο όγκος έγχυσης ήταν 1  $\mu$ L.

## 10. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

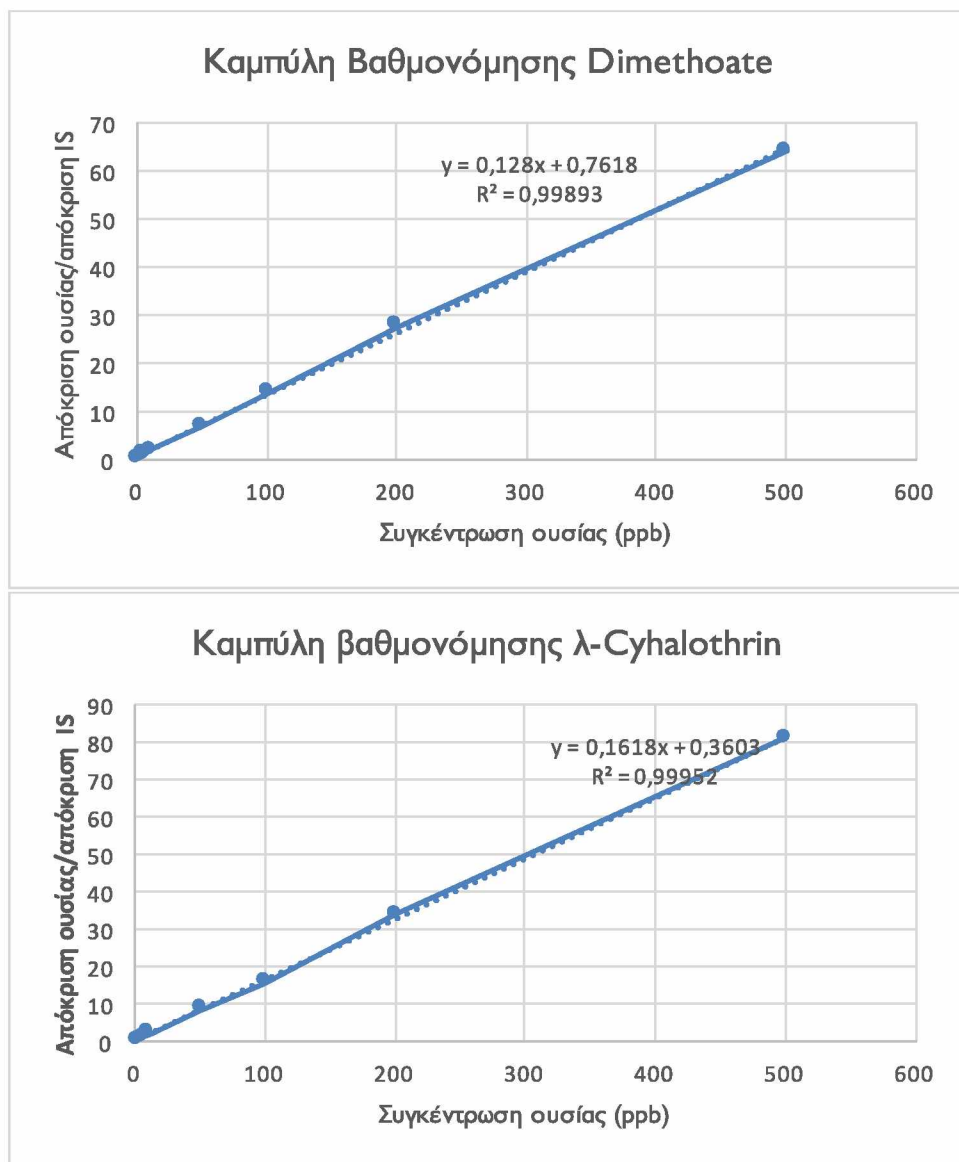
### 10.1. Αξιολόγηση αναλυτικής διαδικασίας-Επικύρωση αναλυτικών μεθόδων

Στη παρούσα εργασία εφαρμόστηκαν επικυρωμένες μέθοδοι του εργαστηρίου για τον προσδιορισμό των υπολειμμάτων γεωργικών φαρμάκων και των μεταβολιτών τους. Παρόλα αυτά οι βασικές παράμετροι-κριτήρια επανελέγχθηκαν ώστε να επιβεβαιωθεί η καταλληλότητα των αναλυτικών μεθόδων, ιδιαίτερα στις μεθόδους που αφορούν τους βομβίνους.

Βάσει της οδηγίας 2002/657/EK της Ευρωπαϊκής Ένωσης, στην οποία αναφέρονται η επίδοση των αναλυτικών μεθόδων και η ερμηνεία των αποτελεσμάτων τους, πραγματοποιήθηκε η ταυτοποίηση και η επιβεβαίωση των αναλυτών στα δείγματά μας. Σύμφωνα με την οδηγία αυτή, με την τεχνική HPLC/MS-MS και με την τεχνική GC/MS-MS απαιτείται ένα σύνολο τεσσάρων μονάδων ταυτοποίησης για κάθε αναλύτη που περιλαμβάνει την παρουσία του συνήθως του μητρικού ιόντος και τουλάχιστον δύο θυγατρικών ιόντων. Σε συνέχεια αυτού, η κύρια κατευθυντήρια οδηγία η οποία ακολουθήθηκε ήταν η οδηγία SANTE/11813/2017, που έχει τίτλο «Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed». Τα κριτήρια που επαναξιολογήθηκαν ήταν τα ακόλουθα:

#### *Γραμμικότητα*

Η γραμμικότητα προσδιορίστηκε με την κατασκευή της καμπύλης βαθμονόμησης, η οποία αποτελείται από επτά επίπεδα συγκέντρωσης, μη μηδενικών συγκεντρώσεων. Απαραίτητη προϋπόθεση ώστε η γραμμικότητα να θεωρηθεί αποδεκτή, ήταν ο συντελεστής προσδιορισμού  $r^2$  να ισούται ή να υπερβαίνει την τιμή 0.99 και παράλληλα η απόκλιση της εκ νέου υπολογιζόμενης συγκέντρωσης (back calculated concentration) να μην υπερβαίνει το  $\pm 20\%$  της πραγματικής συγκέντρωσης. Ως πρώτο σημείο της καμπύλης τέθηκε εκείνο που αντιστοιχεί σε συγκέντρωση ίση με το όριο ποσοτικοποίησης της κάθε ουσίας.



**Εικόνα .** Καμπύλες βαθμονόμησης για το dimethoate και το λ-cyhalothrin (σε εκχύλισμα τυφλού δείγματος μελισσών)

#### *Όριο ποσοτικοποίησης-Πιστότητα-Ορθότητα*

Τα όρια ποσοτικοποίησης της μεθόδου (ΟΠ, LOQ), ορίστηκαν ως τα χαμηλότερα επίπεδα συγκέντρωσης των δραστικών ουσιών με τα οποία έχουν φορτιστεί τυφλά δείγματα των υποστρωμάτων (μέλι, μέλισσες, βομβίνι) τα οποία πληρούν τα σχετικά κριτήρια ορθότητας και πιστότητας. Τα ΟΠ για το dimethoate και το μεταβολίτη του omethoate τέθηκε στα 1 ng/g υποστρώματος, ενώ για τα πυρεθροειδή β-cyfluthrin και λ-cyhalothrin στα 3 ng/g υποστρώματος.

Η ορθότητα ολόκληρης της μεθόδου αξιολογήθηκε σε δείγματα εμβολιασμένα με τις δραστικές ουσίες της μεθόδου, και υπολογίστηκε με μετρήσεις της ανάκτησης επαναλαμβανόμενων μετρήσεων σε τρία επίπεδα συγκέντρωσης εκφραζόμενη ως



ποσοστιαία ανάκτηση (%). Η ορθότητα θεωρήθηκε αποδεκτή διότι οι ανακτήσεις ήταν εντός του εύρους 70-120%, με τιμές σχετικής τυπικής απόκλισης (% RSD)  $\leq 15\%$ .

Η πιστότητα της μεθόδου αξιολογήθηκε με όρους επαναληψιμότητας και αναπαραγωγιμότητας και εκφράστηκε επίσης ως σχετική τυπική απόκλιση. Η επαναληψιμότητα προσδιορίστηκε με τη μέτρηση των τιμών ανακτήσεων την ίδια μέρα σε δύο επίπεδα συγκέντρωσης (ΟΠ και 10 ΟΠ), ενώ η αναπαραγωγιμότητα προσδιορίστηκε με μετρήσεις των ίδιων διαλυμάτων, με τον ίδιο αριθμό επαναλήψεων, σε τρεις ημέρες εντός διαστήματος ενός μηνός. Οι τιμές %RSD έπρεπε να ήταν μικρότερες του 20 %.

Οι μέθοδοι που εφαρμόστηκαν ήταν επαναλήψιμοι και αναπαραγώγιμοι, με %RSD τιμές  $<12\%$  και  $<16\%$  αντιστοίχως για όλες τις δραστικές ουσίες και για όλα τα υποστρώματα.

#### *Χρόνος Κατακράτησης*

Ο χρόνος κατακράτησης του αναλύτη σε ένα εμβολιασμένο δείγμα υποστρώματος σε σύγκριση με αυτόν ενός πρότυπου διαλύματος να έχει μέγιστη απόκλιση  $\pm 0.1$  min, σύμφωνα και με την τελευταία κατευθυντήρια οδηγία της SANTE. Στη συγκεκριμένη εργασία δεν παρατηρήθηκαν μη επιτρεπόμενες αποκλίσεις.

#### *Επίδραση της μήτρας (Matrix Effect)*

Η επίδραση της μήτρας αποτιμήθηκε-προσδιορίστηκε με τη σύγκριση του εμβαδού κορυφής του αναλύτη ενός εκχυλίσματος (δηλαδή φορτισμένων τελικών εκχυλισμάτων τυφλών δειγμάτων) με αυτό ενός διαλύματος σε καθαρό διαλύτη (non-extracted neat solvent) στο ίδιο επίπεδο συγκέντρωσης. Οι επιδράσεις της μήτρας μελετήθηκαν σε δύο επίπεδα συγκέντρωσης. Η απόκρισή τους για κάθε δραστική ουσία δεν ξεπέρασε το  $\pm 20\%$  αυτής των προτύπων, με αποτέλεσμα η επίδραση μήτρας να θεωρείται αμελητέα.

#### *Ποσοτικοποίηση*

Για την ποσοτικοποίηση και την εξαγωγή των τελικών αποτελεσμάτων στα ευρήματα των χημικών αναλύσεων χρησιμοποιούνται συνήθως τρεις τρόποι. Η μέθοδος πολλαπλών εξωτερικών προτύπων με τη χρήση της εκάστοτε καμπύλης βαθμονόμησης, η μέθοδος της παρεμβολής (bracketing), και η μέθοδος ενός εξωτερικού προτύπου.

Η καμπύλη βαθμονόμησης παρασκευάζεται χρησιμοποιώντας σειρά διαλυμάτων βαθμονόμησης του μίγματος των φ.π. σε διαλύτη και σε εκχύλισμα δείγματος κοντρόλ ή λευκού (matrix matched) και εγχύνονται στον χρωματογράφο εις τριπλούν. Τα διαγράμματα βαθμονόμησης έχουν ως άξονες τον λόγο της επιφάνειας κορυφής της δραστικής ουσίας (προς την επιφάνεια κορυφής του εσωτερικού προτύπου άξονας Y, εφόσον

χρησιμοποιήθηκε εσωτερικό πρότυπο), και την συγκέντρωση της δραστικής ουσίας (άξονας X).

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης του αναλύτη με την μέθοδο παρεμβολής πραγματοποιείται χρησιμοποιώντας το ευθύγραμμο τμήμα που ορίζεται μεταξύ δύο φορτισμένων δειγμάτων γνωστής συγκέντρωσης. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιούνται φορτισμένα δείγματα σε δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις. Η συγκέντρωση του αναλύτη θα πρέπει να είναι σε υψηλότερο επίπεδο από την χαμηλότερη συγκέντρωση των φορτισμένων δειγμάτων, ενώ παράλληλα να μην υπερβαίνει την υψηλότερη. Σε περίπτωση που η απόκριση (και επομένως και η συγκέντρωση) των ουσιών υπερβαίνει τις αντίστοιχες τιμές του ανώτερου επιπέδου φόρτισης (περισσότερο από το 30%) τότε απαιτείται αραίωση του δείγματος και επανέγχυσή του. Αν αντίστοιχα είναι μικρότερη, μπορεί είτε να ανέλθει ο όγκος έγχυσης, είτε να προβεί ο αναλυτής σε επεξεργασία μεγαλύτερης ποσότητας δείγματος, ή αν αυτό δεν είναι εφικτό, σε συμπύκνωση του εκχυλισμένου δείγματος.

Η μέθοδος ενός εξωτερικού προτύπου χρησιμοποιείται στις περιπτώσεις όπου η μέθοδος αποδεδειγμένα παρουσιάζει γραμμική καμπύλη βαθμονόμησης και η ευθεία διέρχεται από την αρχή των αξόνων (τομή  $\alpha=0$ ). Τα διαλύματα που χρησιμοποιούνται είναι αντίστοιχα με αυτά που περιγράφονται στις άλλες μεθόδους.

Στην ποιοτική ανάλυση (στη φασματομετρία μάζας), η οποία πραγματοποιήθηκε με την τεχνική παραγωγής θυγατρικών ιόντων, μετρήθηκαν οι αναλογίες των κορυφών μεταξύ του μητρικού και των θυγατρικών ιόντων των δειγμάτων και συγκρίθηκαν με αυτές των προτύπων, ώστε πάντα να φέρουν αναλογία τέτοια που να μην αποκλίνει του  $\pm 30\%$  της τιμής που προκύπτει από το αντίστοιχο πρότυπο. Για αυτή την διαδικασία χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό MassHunter Quantitative Analysis.

Τα μοριακά ιόντα επειδή φέρουν υψηλή ενέργεια μπορούν με την παροχή αερίου σύγκρουσης και υπό συγκεκριμένες οργανολογικές συνθήκες (π.χ. δυναμικά που εφαρμόζονται), να θραυσματοποιηθούν, παρέχοντας τα προκύπτοντα θυγατρικά ιόντα.

**Πίνακας 2.** Παράμετροι των αναλυτικών μεθόδων GC-MS/MS και LC-MS/MS

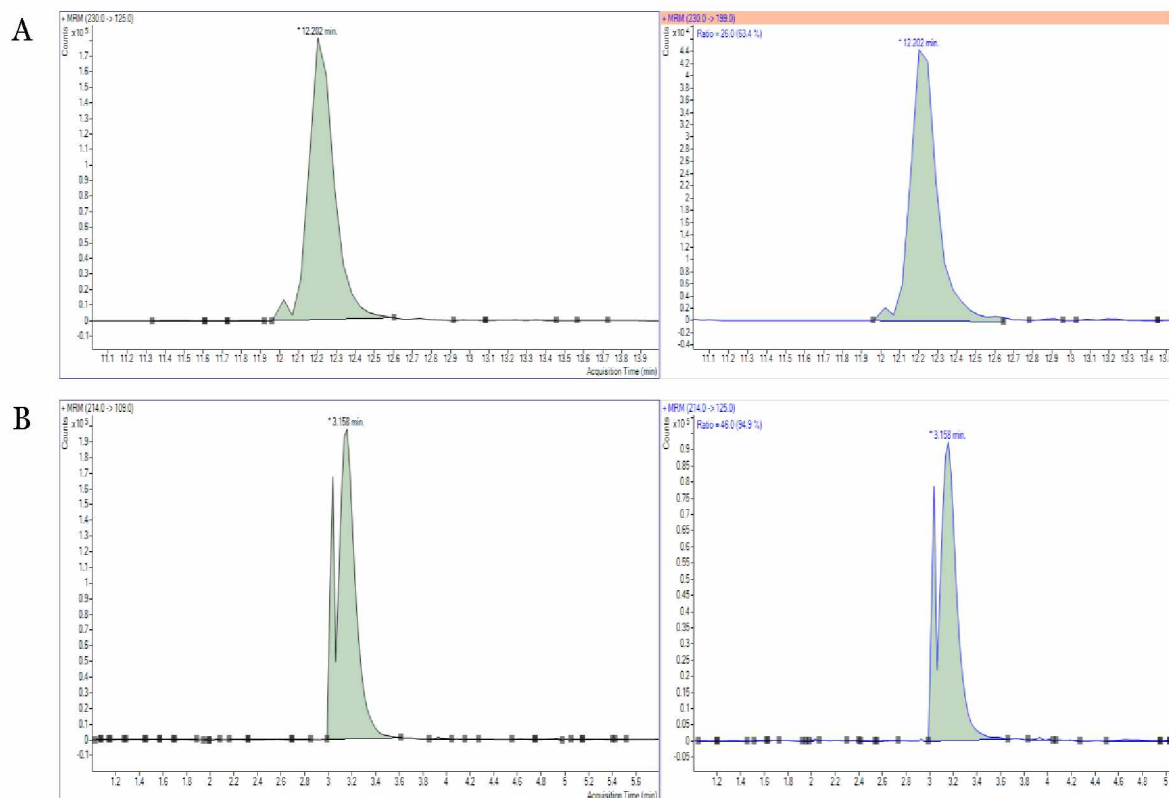
Ουσίες	Χρόνος κατακράτησης (min)	Q1 (m/z)	Q2 (m/z) *	Ενέργεια σύγκρουσης (eV)	Q1 (amu)	Q2 (amu) **	Ενέργεια σύγκρουσης (eV)	Χρόνος Σάρωσης (ms)
λ-cyhalothrin <sup>α</sup>	18,78	181	152	15	181	127	15	300
cyfluthrin <sup>α</sup>	20,58	163	91	15	163	127	16	300
dimethoate <sup>β</sup>	12,98	230	125	29	230	199	13	50
omethoate <sup>β</sup>	3,49	214	109	30	214	125	35	50

<sup>α</sup>, GC-MS/MS, <sup>β</sup>, LC-MS/MS

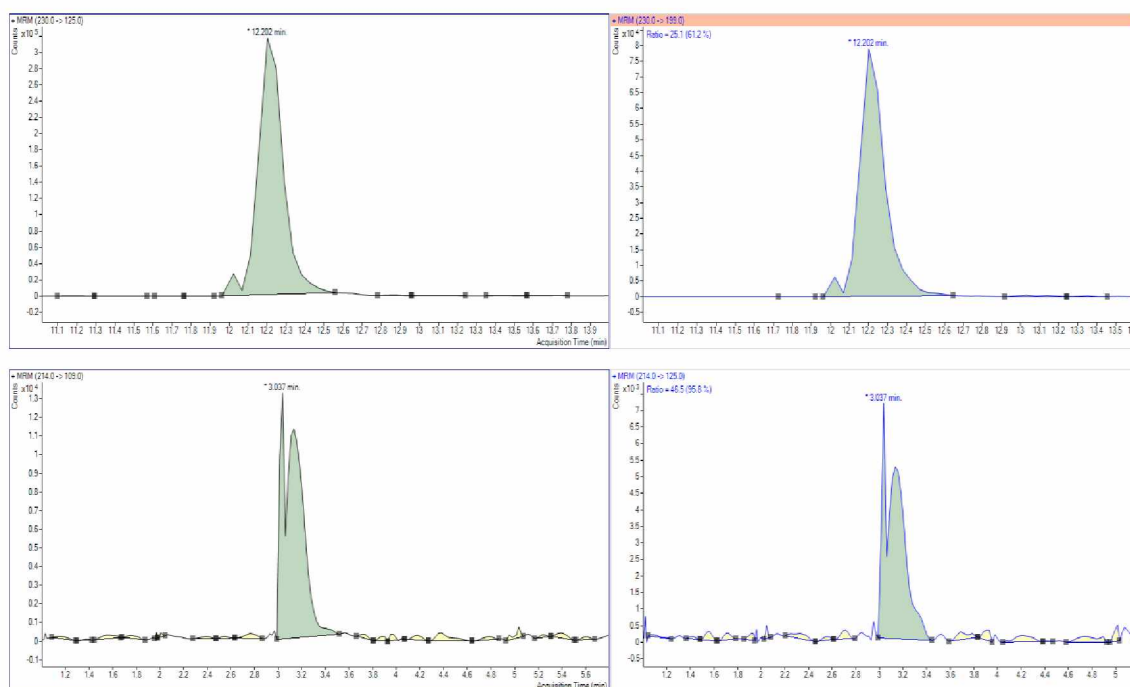
\*Ιόν Ποσοτικοποίησης, \*\*Ιόν Ταυτοποίησης-Επιβεβαίωσης

Από το σύνολο των δειγμάτων που παρελήφθησαν (220 δείγματα) και λόγω της μικρής ποσότητας σε κάποια από αυτά, πραγματοποιήθηκε συγκέντρωση των δειγμάτων (replicates) από την ίδια δειγματοληψία (pooling of samples) με τέτοιο τρόπο ώστε τελικά να κατεργαστούν και να αναλυθούν 73 δείγματα, ήτοι, 35 δείγματα μελισσών, 8 δείγματα βομβινών και 30 δείγματα μελιού.

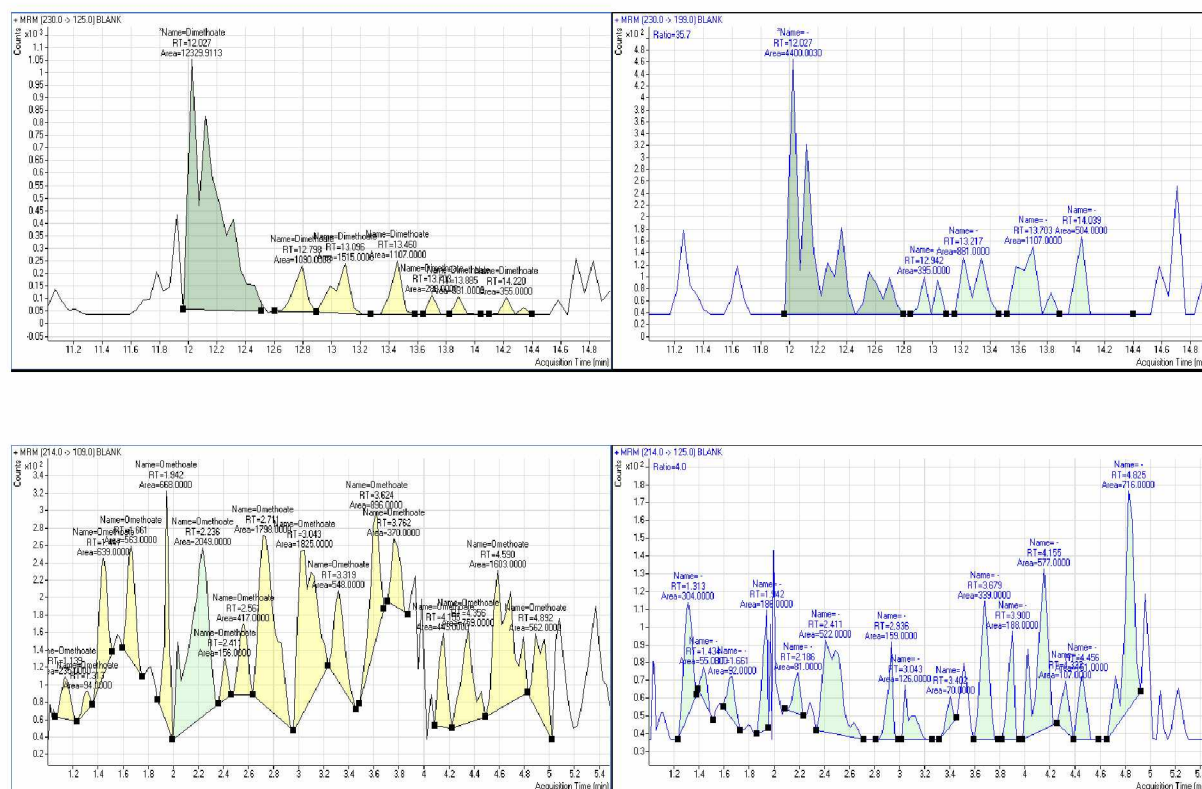
**Εικόνα 1.** MRM χρωματογραφήματα των δραστικών dimethoate (Α) και omethoate (Β) σε φορτισμένο δείγμα μελισσών σε συγκέντρωση 50 ng/g.



**Εικόνα 2.** MRM χρωματογραφήματα των dimethoate και omethoate σε θετικό δείγμα μελισσών



**Εικόνα 3.** MRM χρωματογραφήματα σε δείγμα μελισσών αρνητικό σε dimethoate και omethoate

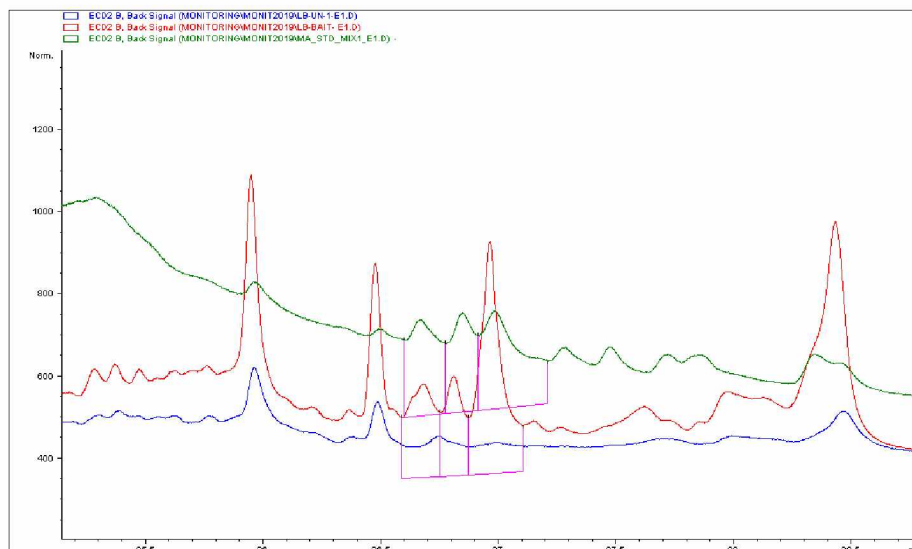


**Πίνακας 2.** Συνοπτικά-συγκεντρωτικά αποτελέσματα χημικών αναλύσεων σε μέλισσες, βομβίνους και μέλι

Έτος (2018)	Δραστικές ουσίες και εύρος συγκέντρωσης (ng/g υποστρώματος)				Αριθμός Ευρημάτων	
Υπόστρωμα	Dimethoate	Omethoate	β-Cyfluthrin	λ-Cyhalothrin	Θετικά*	Αρνητικά
Μέλισσες	<ΟΠ-12,6	2,4-20,5	9-652	<ΟΠ-9	15	20
Βομβίνοι	4,1-702,5	1,3-59,3	nd	5.1	6	2
Μέλι	5,7-22,2	5,1-30,6	nd	48	13	17

\*σε τουλάχιστον μία δραστική ουσία

**Εικόνα 4.** GC-ECD επικαλυπτόμενα χρωματογραφήματα δείγματος μελισσών θετικό σε cyfluthrin (κόκκινο), διαλύματος αναλυτικού προτύπου cyfluthrin (πράσινο) σε συγκέντρωση 20 ng/mL και δείγματος κοντρόλ μελισσών (μπλε).



Σε ότι αφορά το μέλι η κυρίαρχη ανίχνευση αφορούσε το dimethoate και το μεταβολίτη του omethoate. Για τις δύο αυτές δραστικές ουσίες δεν έχουν θεσπιστεί MRL. Άλλο ένα δείγμα ήταν θετικό στην δραστική ουσία λ-cyhalothrin σε συγκέντρωση οριακά κοντά στο θεσπισμένο για αυτή την ουσία MRL, στα 0,05 mg/kg (ή 50 ng/g μελιού). Στο μέλι επίσης σε λίγα δείγματα ανιχνεύτηκε σε πιλοτικές αναλύσεις (με υφιστάμενες μεθόδους του Εργαστηρίου) και η δραστική ουσία coumaphos η οποία χρησιμοποιείται ευρέως στην μελισσοκομία ως βασικό συστατικό σκευασμάτων για την καταπολέμηση του ακάρεος της Βαρρόα, χωρίς όμως τα υπολείμματα που προσδιορίστηκαν να ξεπερνούν το MRL που έχει θεσπιστεί και είναι 100 ng/g μελιού (COMMISSION REGULATION (EU) No 37/2010). Η δράση του coumaphos είναι επίσης εντομοκτόνος, αναστέλλοντας τη δράση του ενζύμου της χολινεστεράσης με αποτέλεσμα την συσσώρευση της ακετυλοχολίνης σε συγκεκριμένη



νευρομυϊκή σύναψη, και τελικά την διέγερση του παρασίτου, που οδηγεί σε παράλυση και στο θάνατό του.

Σε αυτό το σημείο πρέπει να τονιστεί ότι η παρουσία υπολειμμάτων στο μέλι υποδηλώνει την αναγκαιότητα τόσο ευρύτερα οι γεωργικές πρακτικές, όσο και οι ψεκασμοί ειδικότερα να πραγματοποιούνται σύμφωνα με την ορθή γεωργική πρακτική, να τηρούνται αυστηρά όλες οι οδηγίες που αναγράφονται στην ετικέτα των φυτοπροστατευτικών προϊόντων ώστε να ελαχιστοποιείται η μεταφορά υπολειμμάτων στα ωφέλιμα έντομα, και στα τελικά προϊόντα της κυψέλης (στη περίπτωση των μελισσών). Λαμβάνοντας υπόψη την ευρεία κατανάλωση του μελιού, ειδικά και από την ευαίσθητη πληθυσμιακή ομάδα των παιδιών, εύρεση τυχόν υπολειμμάτων ακόμα και κάτω από τα MRL πρέπει να λαμβάνεται υπόψη από τις αρχές ελέγχου, και από τους μελισσοκόμους, ώστε να παίρνονται όλα τα μέτρα εκείνα που θα ‘απαλλάξουν’ το μέλι από τυχόν υπολείμματα γεωργικών φαρμάκων και μεταβολιτών τους. Το ίδιο φυσικά ισχύει και για άλλες χημικές ουσίες οι οποίες χρησιμοποιούνται ή χρησιμοποιούνταν στο παρελθόν στο κλάδο της μελισσοκομίας.

Ειδικά η χρήση αντιβιοτικών και άλλων κτηνιατρικών ουσιών (veterinary medicinal products) έχει περιγραφεί ευρέως στο πλαίσιο φαρμακευτικών χρήσεων στη μελισσοκομία, κυρίως για την καταπολέμηση ακάρεων και παθογόνων (των μικροσποριδίων *Nosema Apis*, *Nosema ceranae*) στο χώρο της κυψέλης. Εν τούτοις, οι δυσμενείς επιδράσεις-επιπτώσεις κάποιων εξ’ αυτών των ουσιών στην ανθρώπινη υγεία, είχε ως αποτέλεσμα την απαγόρευση της χρήσης τους στο πλαίσιο της «μηδενικής ανοχής» (zero tolerance). Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν τα αντιβιοτικά όπως η χλωραμφενικόλη, και η φουμαγγιλίνη, όπου πρακτικά δεν πρέπει να βρίσκονται υπολείμματα των δραστικών ουσιών. Αυτό είναι κατανοητό ότι συσχετίζεται με την ευαισθησία των αναλυτικών οργάνων (ικανά όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης) και των μεθόδων να ανιχνεύουν τα υπολείμματα των οργανικών αυτών ενώσεων.

Σε αυτό το πλαίσιο οι αναλυτικές μέθοδοι που εφαρμόστηκαν εξυπηρέτησαν το σκοπό της μελέτης, διότι:

α) για όλες τις δραστικές ουσίες τα ΟΠ (LOQ) ήταν κατώτερα των MRL στο μέλι, και β) σε ότι αφορά τις μέλισσες και τους βομβίνους, τα ΟΠ ήταν κατώτερα των μέσων θανατηφόρων δόσεων (LD50) δια κατάποσης και δια επαφής. Οι τιμές LD50 για τις δραστικές ουσίες που μελετήθηκαν στο πλαίσιο αυτής της εργασίας παρουσιάζονται στο παρακάτω Πίνακα.

**Πίνακας 1.** LD50 τιμές\* (oral and contact) of all neonicotinoids and related compounds including nicotine.

<b>Δραστική Ουσία</b>	<b>Μέλισσες LD50</b> (ng/g σωματικού βάρους μέλισσας)		<b>Βομβίνοι LD50</b> (ng/g σωματικού βάρους βομβίνου)	
	<b>Δια κατάποσης</b>	<b>Δια επαφής</b>	<b>Δια κατάποσης</b>	<b>Δια επαφής</b>
Dimethoate	1000	1000	>3300	>9400
Omethoate	480	**	**	**
β-Cyfluthrin	500	10	1200	4600
λ-Cyhalothrin	9100	380	≥1600	1100

\*Τιμές που αναφέρονται στην έγκριτη βάση δεδομένων PPDB Pesticides Properties DataBase (<https://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/atoz.htm>)

\*\*Στην προσβάσιμη βιβλιογραφία δεν υπάρχουν διαθέσιμα δεδομένα για τη μέση θανατηφόρο δόση

Στη συγκεκριμένη μελέτη, είναι σημαντικό, εξ' όσων γνωρίζουμε, ότι για πρώτη φορά στην Ελλάδα μελετήθηκε η υπολειμματικότητα γεωργικών φαρμάκων στους βομβίνους. Οι βομβίνοι, επιτελούν σημαντικό έργο ως επικονιαστές, τόσο στα φυσικά οικοσυστήματα όσο και στη γεωργία, και οποιαδήποτε αναφορά σε επιστημονικά ευρήματα που αφορούν την εύρεση οργανικών ρυπαντών (και ρυπαντών γενικότερα) σε αυτούς είναι σημαντική. Είναι επίσης γνωστό ότι πλέον η εκτίμηση επικινδυνότητας σε ότι αφορά τις μέλισσες, δεν έχει περιοριστεί μόνο στις μέλισσες του γένους *Apis* (χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το είδος της κοινής ή δυτικής μέλισσας *Apis mellifera*), αλλά και στις άγριες μέλισσες, όπως είναι οι βομβίνοι, οι οποίοι παγκοσμίως αριθμούν 250 είδη. Στην Ευρώπη έχουν αναγνωριστεί 70 είδη, και στην Ελλάδα έχουν καταγραφεί έως σήμερα 33 είδη. Τέλος, οι άγριες απόμερες μέλισσες (solitary bees) αποτελούν επίσης αντικείμενο έρευνας με ολοένα αυξανόμενο ενδιαφέρον που φαίνεται και στον αριθμό των σχετικών δημοσιεύσεων την τελευταία δεκαετία, και περιλαμβάνονται στη κατευθυντήρια οδηγία που εξέδωσε η EFSA και αφορούσε στην εκτίμηση επικινδυνότητας των φυτοπροστατευτικών προϊόντων στις μέλισσες [(Guidance on the risk assessment of plant protection products on bees (*Apis mellifera*, *Bombus* spp. and solitary bees))].

Σε ότι αφορά τη κατάτμηση των αποτελεσμάτων σε σχέση με τις εφαρμογές (κάλυψης και δολωματικός) που έγιναν στο πεδίο δεν παρατηρήθηκε ιδιαίτερος διαχωρισμός τόσο σε

συχνότητα ανιχνεύσεων των δραστικών ουσιών, όσο και στα επίπεδα συγκέντρωσης που καταγράφηκαν μεταξύ των δολωματικών και των ψεκασμών καλύψεως.

Συγκεκριμένα, σε ότι αφορά τους βομβίνους (αν και ο αριθμός δειγμάτων ήταν μικρός) οι υψηλότερες συγκεντρώσεις παρατηρήθηκαν σε δείγματα που συλλέχθηκαν σε αγροτεμάχια στα οποία είχαν γίνει δολωματικοί ψεκασμοί. Σε ότι αφορά στα μέλια που συλλέχθηκαν έπειτα και των δύο τρόπων εφαρμογής, δεν καταγράφηκε σημαντική διακύμανση στα επίπεδα συγκέντρωσης των δραστικών που ανιχνεύτηκαν. Αντίστοιχη ήταν η εικόνα στις διακυμάνσεις και τη συχνότητα στις μέλισσες, με τη μόνη διαφορά ότι σε αυτές ανιχνεύτηκαν όλες οι δραστικές ουσίες (το β-cyfluthrin δεν ανιχνεύτηκε στους βομβίνους και στο μέλι), ωστόσο και ο αριθμός δειγμάτων τους ήταν μεγαλύτερος.

Σε ότι αφορά την συσχέτιση των προσδιορισθέντων συγκεντρώσεων με την συμπεριφορά των μελισσών, σε ένα δείγμα μελισσών παρατηρήθηκε ότι η ευρεθείσα συγκέντρωση σε β-cyfluthrin υπερέβη και τις δύο μέσες θανατηφόρες δόσεις (σε 3 άλλα δείγματα υπέρβαση μόνο της LD50 δια επαφής). Εν τούτοις, δεν παρατηρήθηκε θνησιμότητα, γεγονός που αποδίδεται στην άμεση δειγματοληψία των μελισσών (την ίδια ημέρα της εφαρμογής).

Συμπερασματικά, αν και η ελαιοκαλλιέργεια δεν θεωρείται η πιο ελκυστική ανθοφορία για τις μέλισσες, στην εργασία αυτή αποτυπώθηκε η αλληλεπίδραση των ψεκασμών σε ελαιόδενδρα σε σχέση με τις μέλισσες, τους βομβίνους και το μέλι, ως το κατεξοχήν προϊόν της κυψέλης. Λαμβάνοντας υπόψη τη διεθνή βιβλιογραφία (Martin et al., 2005), ένα ώριμο δένδρο ελιάς στο στάδιο της πλήρους ανθοφορίας μπορεί να έχει μέχρι και 500.000 άνθη. Επομένως το πλήθος του αριθμού των ανθέων μαζί με πρόσφατη επιστημονική εργασία που δείχνει ότι οι μέλισσες επισκέπτονται συχνά τα ελαιόδενδρα (ειδικά τη περίοδο ανθοφορίας τους) (Giovanetti 2018), καθιστούν δεδομένη την ανάγκη παρακολούθησης του πληθυσμού των μελισσών, συμπεριλαμβανομένων και των άγριων μελισσών, όταν γειτνιάζουν σε ελαιοκαλλιέργειες, και ειδικά αν στα παρακείμενα αγροτεμάχια δεν υπάρχουν περισσότερο ελκυστικές ανθοφορίες. Σε κάθε περίπτωση και ως ένα επόμενο βήμα σε αυτή την εργασία θα είναι η δειγματοληψία αντίστοιχων δειγμάτων κατά τη διάρκεια ή ακριβώς μετά την περίοδο ανθοφορίας της ελιάς ώστε να αποτιμηθεί πόσο οι πτήσεις των μελισσών επηρεάζονται από την πιθανή υπολειμματικότητα οργανικών ρυπαντών που μπορεί να απαντώνται στο άνθος της ελιάς.

## Βιβλιογραφία

- M. Anastassiades, S. J. Lehotay, D. Stajnbaher, F. J. Schenck, Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solidphase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. *Journal of AOAC International*, vol. 86, 2003, pp. 412-431.
- Bigler, F., 1982. Die postlarvale Mortalität der Olivenfliege, *Dacus oleae* Gmel. (Dipt., Tephritidae), in Oleastergebieten von Westkreta. *Z. Ang. Entom.* 93: 76-89.
- Boskou D. (1996) *Olive oil, Chemistry and Technology*, AOCS PRESS, Campaign, Illinois.
- Broufas G.D., M.L. Pappas and D.S. Koveos, (2009). Effect of relative humidity on reproduction, longevity and ovarian maturation of the tephritid fly *Bactocera* (*Dacus*) *oleae*. *Annals of the Entomological Society of America* 102: 70-75.
- Casarett & Doull's toxicology. The basic science of poisons, Fifth edition.; Klaassen, C. D., Amdur, M. O., Doull, J., Eds.; McGraw-Hill: New York, 1996.
- Dadd, R.H. 1973. Insect nutrition: current developments and metabolic implications. *Ann. Rev. Entomol.* 18:381-420.
- Delrio, G., 1978. Fattori di regolazione delle popolazioni di *Dacus oleae* Gmelin nella Sardegna nord-occidentale. *Not. Mal. Piante* 98-99: 27-45
- Douglas A. Skoog, F. James Holler, Timothy A. Nieman, *Principles of Instrumental Analysis*, fifth edition, σε μετάφραση Αρχές Ενόργανης Ανάλυσης: Κεφ: 1, 10, 26, 27, 28 εκδόσεις Κωσταράκη, 2005, Αθήνα
- Frehse H., *Pesticide Chemistry*, Proceedings of the Seventh International Congress of Pesticide Chemistry (IUPAC) Hamburg 1990, VCH, Weinheim, 1991, p.p 267-268, 564-575
- Garrido Fernandez, A., Fernandez Diez, M.J. and Adams, M.R., 1997, «Table Olives: Production and Processing», Chapman & Hall, London
- Genç, and Nation, J. L., (2008). Maintaining *Bactrocera oleae* (Gmelin.) (Diptera: Tephritidae) on its natural host in the laboratory. *J Pest Sci* 81:167–174.
- Giovanetti M. Do bees like olive? A preliminary analysis of honey bee behaviour on flowers of the wind-pollinated species *Olea europaea*. *Acta Horticulturae* 2018: 121-126
- Hassall, K.A., 1990. *The Biochemistry and Uses of Pesticides*, 2nd Edition. MacMillan Press, London, 535p

- Huang, Z. 2012. Honey bee nutrition. *Am. Bee. J.* 150(8):773-776.
- Kapatos, E. & Fletcher, B.S., 1984 . The phenology of the olive fruit fly, *Dacus oleae* (Gmelin) (Diptera, Tephritidae), in Corfu. *Zeit. ang. Ent.* (97)4: 360-370.
- Kapatos, E. & Fletcher, B.S., 1986. Mortality factors and life-budgets for immature stages of the olive fly, *Dacus oleae* (Gmelin) (Diptera, Tephritidae) in Corfu. *J. Appl. Entomol.* 102: 326- 342.
- Kasiotis KM, Anagnostopoulos C, Anastasiadou P, Machera K. Pesticide residues in honeybees, honey and bee pollen by LC-MS/MS screening: reported death incidents in honeybees. *Sci Total Environ* 2014; 485-486: 633-42.
- Kasiotis KM, Tzouganaki ZD, Machera K. Chromatographic determination of monoterpenes and other acaricides in honeybees: Prevalence and possible synergies. *Sci Total Environ* 2018; 625: 96-105.
- Katsoyiannos, P. 1992. Olive pests and their control in the Near East. Rome, FAO of the United Nations.
- Kiritsakis A., Deterioration of olive oil. In: Olive oil. A. Kiritsakis (Ed) AOCS PRESS, Campaign, Illinois, 1990, 104-127, pp. 13-15
- Korneyev V.A., (1999). Phylogenetic relationships among higher groups of Tephritidae, p. 73-113. In M. Aluja & A. L. Norrbom, eds., *Fruit flies (Tephritidae): Phylogeny and evolution of behavior*. CRC Press, Boca Raton. [16] + 944 p
- Koveos, D.S., (2001). Rapid cold hardening in the olive fruit fly *Bactrocera oleae* (Rossi) under laboratory and field conditions. *Entomologia experimentalis et Applicata* 101: 257-263.
- Koveos D.S. and M.E. Tzanakakis, (1990). Effect of the presence of olive fruit on ovarian maturation in the olive fruit fly *Dacus oleae*, under laboratory conditions. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 55: 161-168
- Koveos D.S. and M.E. Tzanakakis, (1993). Diapause aversion in the adult olive fruit fly through effects of the host fruit, bacteria, and adult diet. *Annals of the Entomological Society of America* 86: 668-673.
- C.C. Leandro, R.J. Fussell, B.J. Keely, J. *Chromatogr. A* 1085 (2005) 207
- S.J. Lehotay, K. Mastovska, A.R. Lightfield, J. *AOAC Int.* 88 (2005) 615
- R. P. Lopes, T. E. De Freitas Passos, J. F. De Alkimim Filho, E. A. Vargas, D. V. Augusti, and R. Augusti, Development and validation of a method for the determination of sulfonamides in animal feed by modified QuEChERS and LC-MS/MS analysis, *Food Control*, vol. 28, no. 1, 2012, pp. 192-198.

- Martelli, G.M., 1963. La mosca delle olive e gli estremi termici. Boll Lab. Entomol. Agr. Portici 21:236-242
- Martin, G.C., Ferguson, L., Sibbet, G.S. (2005). Flowering, pollination, fruiting, alternate bearing and abscission, In: Olive production manual (Eds Sibbet, G.S., Ferguson, L.), p. 49–54. University of California Agriculture and Natural Resources, Oakland.
- Mohammad Athar, (2005). Infestation of Olive Fruit Fly, *Bactrocera oleae*, in California and Taxonomy of its Host Trees Agric. conspec. sci. Vol. 70 (2005) No.-Nakbi Amel, Tayeb Wafa, Grissa Abir, Issaoui Manel, Dabbou Samia, Chargui Issam, Ellouz Meriem, Miled Abdelhedi, Hammami Mohamed, 2010. Effects of olive oil and its fractions on oxidative stress and the liver's fatty acid composition in 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid-treated rats.
- Nardi F., A. Carapelli, R. Dallai, G.K. Roderick, F. Frati, (2005). Population structure and colonization history of the olive fly, *Bactrocera oleae* (Diptera, Tephritidae). Mol Ecol. (9): 2729-38
- Orfanidis, P.S. & Karayannis, G.B., 1958. Observation concernant l'influence exercee par de hautes temperatures prolongees sur la population du *Dacus*. Ann. 1st. Phytopath. Benaki (N.S.)1(4): 219-222
- Otis, G.W. 1991. A Review of the Diversity of Species Within *Apis*. In: D.R Smith (ed.). Diversity in the Genus *Apis*. Westview Press, Inc., Boulder Colorado. 265 pp.
- Pappas, S., Kapatos, E. & McFadden M.W., 1977. Ecological studies on the olive fly *Dacus oleae* Gmelin. In Corfu: III. The action of hymenopterous parasites. Boll. Lab. Ent. Agr. Portici 34: 80-86
- C. Przybylski, C. Segard, J. Sep. Sci. 32 (2009) 1858
- Pucci, C., Forcina, A. & Salmistraro, D., 1982. "Incidenza della temperatura sulla mortalita' degli stadi preimmaginali, sull'attivita' dei parassiti del *Dacus Oleae* (Gmel.) ", Frustula Entomologica, nuova serie Vol. IV, Pisa. pp. 143-155
- Rhizopoulou S., (2007). *Olea europaea* L. A Botanical Contribution to Culture. American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences 2 (4): 382-387.
- Rice, R. E., (2000). Bionomics of the olive fruit fly *Bactrocera* (*Dacus*) *oleae*. KAC. Plant Protection Quarterly vol 10: 1–11
- Robert L. Metcalf, Insect Control στην Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Wiley-VCH, Weinheim, 2002
- Ruttner, F. 1988. Biogeography and Taxonomy of Honeybees. Springer-Verlag, Berlin. 284 pp.



- A. Sadowska-Rociek, M. Surma and E. Cieřlik, Application of QuEChERS Method for Simultaneous Determination of Pesticide Residues and PAHs in Fresh Herbs, Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 2013, in press.
- SANTE/11813/2017. Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed.
- Schenck, F.J., Callery, P., Gannett, P.M., Daft, J.R., & Lehotay, S.J. (2002) J. AOAC Int. 85, 1177–1180
- Skouras, P. J., Margaritopoulos, J. T., Seraphides, N. A., Ioannides, I. M., Kakani, E. G., Mathiopoulos, K. D., and Tsitsipis, J. A., (2007). Organophosphate resistance in olive fruit fly, *Bactrocera oleae*, populations in Greece and Cyprus. *Pest Manag Sci* 63:42–48
- Smith, H.T., (2001). FruitFly Cooperative Control Program: Final Environmental Impact Statement, United States Department of Agriculture (USDA) (2001).
- Suzanne M. Snedeker. (2001), Pesticides and Breast Cancer Risk: A Review of DDT, DDE, and Dieldrin. *Environmental Health Perspectives*, Vol. 109 (S1): 35-47.
- Steinwandter, H. (1992) in *Emerging Strategies for Pesticide Analysis*, T. Cairns & J. Sherma (Eds), CRC Press, Boca Raton, FL, pp 3–38
- Tingek, S., G. Koeniger and N. Koeniger 1996. Description of the new cavity nesting species of *Apis* (*Apis nuluensis*) from Sabah, Borneo with notes on its occurrence and reproductive biology (Hymenoptera: Apoidea: Apini). *Senckenbergiana Biol.* 76:115-119
- Tzanakakis, M.E., (2006). *Insect and mites feeding on olive*. Brill. Leiden. Boston, pp. 85-106
- Tzanakakis M.E. and D.S. Koveos, (1986). Inhibition of ovarian maturation in the olive fruit fly *Dacus oleae* (Diptera: Tephritidae), under long photophase and an increase of temperature. *Annals of the Entomological Society of America* 79: 15-18.
- Usui, Y. Hayashizaki, T. Minagawa, M. Hashiyada, A. Nakano and M. Funayama, Rapid determination of disulfoton and its oxidative metabolites in human whole blood and urine using QuEChERS extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Legal Medicine*, vol. 14, no. 6, 2012, pp. 309-316
- Paul Vossen, Lucia G. Varela, and Alexandra Devarenne. Olive Fruit Fly. April 2004.
- H. L. Martinez Vidal, A. Garrido Frenich, *Pesticide Protocols*, HUMANA PRESS, 2005.
- Walton M.P., (1995). Integrated Pest Management in olives. In: David Dent, *Integrated Pest Management*. London, Chapman and Hall, pp. 222-240
- Laure Wiest, Audrey Buleté, Barbara Giroud, Cédric Fratta, Sophie Amic, Olivier Lambert, Hervé Pouliquen, Carine Arnaudguilhem, Multi-residue analysis of 80 environmental

contaminants in honeys, honeybees and pollens by one extraction procedure followed by liquid and gas chromatography coupled with mass spectrometric detection, Journal of Chromatography A, Volume 1218, Issue 34, 26 August 2011, Pages 5743-5756

-R.C. Willoughby and R.F. Browner, Anal.Chem., 1984, 56,2626

-Αλυγιζάκης, Μ., 1982, «Επεξεργασία και Κονσερβοποίηση της Επιτραπέζιας Ελιάς», Αθήνα.

-Γεωργαράκης, Μ. (2009), Μέθοδοι ελέγχου φαρμάκων, Θεσσαλονίκη

-Γιαννοπολίτης, Κ.Ν, (2009). Στατιστικά στοιχεία Η παραγωγή και εμπορία ελαιολάδου και επιτραπέζιας ελιάς στον κόσμο Γεωργία – Κτηνοτροφία, τεύχος 6.

-Γρηγοριάδου, Α.Κ. 2003. Μελέτη της in vitro αναπαραγωγής ελληνικών ποικιλιών ελιάς. Θεσσαλονίκη

-Δημόπουλος Β., φυτοπροστατευτικά προϊόντα, Αθήνα, 1998, σελ 28-32, 35, 50-51, 53-57

-Δήμου, Ε., 2002. Οικολογική μελέτη του δάκου της ελιάς, *Bactrocera* (*Dacus*) *olea* (Gmelin) στη περιοχή της Αχαΐας. Διδακτορική διατριβή παν/μίου Πατρών, pp 116.

-Ζακυνθινός Γεώργιος. Διδακτικές σημειώσεις: Επεξεργασία ελαιοκάρπου. Καλαμάτα, 2010

-Ζιώγας Β.Ν., 1996. δάκος της ελιάς. Εκδ. Υπ. Γεωρ. Περιφερ. Κέντρο Προστ. Φυτών & Ποιοτ. Ελ. Πειραιά.

-Γεωργική Φαρμακολογία., Βασίλειος Ζιώγας, Αναστάσιος Μάρκογλου., έκδοση Α , Ελληνικής Έκδοσης, Αθήνα 2007.

-Κυριτσάκης Α., Ελαιόλαδο. Συμβατικό και βιολογικό, βρώσιμη ελιά-πάστα ελιάς. Θεσσαλονίκη, 2007

-Κωβαίος, Δ. Σ., Μπούφας, Γ. Δ., και Γεωργαντζή, Δ., (2001). Ταχύς εγκλιματισμός στο κρύο του δάκου της ελιάς *Bactrocera oleae* (Rossi), σε συνθήκες εργαστηρίου και υπαίθρου.

-Μενκίσογλου Ο., (1998), Γεωργικά Φάρμακα, Θεσσαλονίκη: Εκδόσεις Πήγασος 2000.

-Μουρκίδου – Παπαδοπούλου Ε., (1991), Γεωργικά Φάρμακα, Θεσσαλονίκη : Α.Π.Θ., Υπηρεσία Δημοσιευμάτων.

-Μπαλαγιάννης Π.Γ. (1983). Εγχειρίδιο Γεωργικών Φαρμάκων. Σταμούλης Α., Πειραιάς

-Μπαλατσούρας Γ.Δ., 1995. Η επιτραπέζια ελιά (ποικιλίες-χημική σύσταση-ποιότητα χαρακτηριστικά). Β Έκδοση. Εκδόσεις Πελεκάνος. Αθήνα.

-Μπούμας, Θ. και Κατσόγιαννος, Π., (2009). Εχθροί της ελιάς. Γεωργία – Κτηνοτροφία 6: 102-126

-Παπαδοπούλου- Μουρκίδου Ε. (1991). Διδακτικές σημειώσεις κατά τις παραδόσεις του μαθήματος Γεωργικά Φάρμακα Μέρος Ι, Τμήματος Γεωπονίας Α.Π.Θ. Θεσσαλονίκη: Υπηρεσία δημοσιευμάτων.

-Γεωργικά Φάρμακα., Ευθυμία Παπαδοπούλου – Μουρκίδου, Εκδόσεις Μεθεξίς, Θεσσαλονίκη 2008.

-Πρακτικά 9ου Πανελλήνιου Εντομολογικού Συνεδρίου, Ιωάννινα, 13-16 Νοεμβρίου. σελ. 34-42.

-Τζανακάκης, Μ.Ε. & Κατσόγιαννος, Β.Ι. (2003). Έντομα Καρποφόρων Δέντρων και Αμπέλου. Εκδόσεις Αγρότυπος. Θεσσαλονίκη, 265 σελ

-Χαριζάνης Χρ. Πασχάλης. Μέλισσα και Μελισσοκομική Τεχνική, Γ' Έκδοση, Αθήνα, 2014.

-Χατζιωάννου Θ. Π., Καλοκαιρινού Α. Κ., Τιμοθέου-Ποταμιά Μ. Ποσοτική Ανάλυση. Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα 2006.

-Χατζιωάννου,Θ.Π& Κουμπάρης,Μ.Α(1990), Ενόργανη Ανάλυση, Αθήνα

-Φανή Χατζήνα, <http://www.melinet.gr/item/fitopharmaka2007.pdf>

-Η καλλιέργεια της ελιάς, Υπουργείο Γεωργίας Κύπρου , Λευκωσία, 2014 σελ. 2-3

<https://www.britannica.com/technology/insecticide>

<http://www.musioelias.gr/el/node/15>

<http://www.elies-ladikalamatiano.gr/olive/agronomy/pest-diseases-of-the-olive.html>

[http://eclass.uth.gr/eclass/modules/document/file.php/SGEA173/Insecticides\\_1.pdf](http://eclass.uth.gr/eclass/modules/document/file.php/SGEA173/Insecticides_1.pdf)

[http://www.minagric.gr/syspest/SYSPEST\\_ENEMY\\_dron.aspx](http://www.minagric.gr/syspest/SYSPEST_ENEMY_dron.aspx)

European Commission (2009), Fact Sheet: EU action on pesticides. Available at [http://ec.europa.eu/food/plant/plant\\_protection\\_products/index\\_en.htm](http://ec.europa.eu/food/plant/plant_protection_products/index_en.htm) (April 20 2013).